

**Universidade Federal de Minas Gerais
Instituto de Ciências Biológicas
Departamento de Fisiologia e Biofísica
Pós-Graduação em Ciências Biológicas – Fisiologia e Farmacologia**

**Vias de sinalização ativadas pela alamandina em
cardiomiócitos**

Itamar Couto Guedes de Jesus

Belo Horizonte - MG

2016

Universidade Federal de Minas Gerais
Instituto de Ciências Biológicas
Departamento de Fisiologia e Biofísica
Pós-Graduação em Ciências Biológicas – Fisiologia e Farmacologia

Vias de sinalização ativadas pela alamandina em cardiomiócitos

Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas – Fisiologia e Farmacologia da Universidade Federal de Minas Gerais como requisito para obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas

Itamar Couto Guedes de Jesus
Orientadora: Prof^a. Dr^a. Silvia Guatimosim
Co-orientador: Prof^o. Dr^o. Robson Augusto Souza dos Santos

Belo Horizonte - MG

2016

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Sinalização Intracelular do Departamento de Fisiologia e Biofísica do Instituto de Ciências Biológicas (ICB) da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG) e contou com suporte financeiro do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Coordenação do Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e da Fundação de Amparo à Pesquisa do estado de Minas Gerais (FAPEMIG).

“The heart of creatures is the foundation of life, the Prince of all, the sun of their microcosm, from where all vigor and strength does flow.”

William Harvey, De Motu Cordis, 1628

AGRADECIMENTOS

Muitíssimo obrigado a professor Silvia Guatimosim por ter me aceitado como seu aluno e pela orientação oferecida nestes dois anos. Obrigado!

A minha mãe, meu pai, minha avó, minhas irmãs e minha sobrinha por ter vivido comigo estes dois anos de mestrado mesmo estando a 1600 km de distância.

Ao meu co-orientador, professor Robson, por ter cedido todos os peptídeos utilizados neste trabalho e pelas reuniões sempre interessantes que tivemos ao longo destes dois anos.

A todos os meus amigos de laboratório: Amanda, Pedro e Cibele, por ter me ajudado no treinamento de canulação de coração de camundongo; ao Sérgio por ter feito todas as culturas de cardiomiócito neonato que estão neste trabalho; a Fabiana pela ajuda na realização dos experimentos de PCR *Real time*; aos alunos de iniciação científica Carol, Isabela, Kariny, Luis Felipe e Nayara pelo suporte em grande parte dos experimentos presentes neste trabalho; a Isabela por todas nossas conversas e a Vanessa pela ajuda oferecida quando precisei. Obrigado!

A técnica do Laboratório de Hipertensão, Marilene, pela ajuda quando precisei de peptídeos.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Sistema Renina-Angiotensina. Ang: Angiotensina; AT1: Receptor da Ang II tipo 1; AT2: Receptor da Ang II tipo 2; ECA: Enzima conversora de angiotensina; ECA2: Enzima conversora de angiotensina 2; Mas: Receptor da Ang-(1-7), MrgD: Receptor acoplado a proteína G relacionado ao Mas tipo - D; NEP: Endopeptidase neutra; PEP: Prolil-endopeptidase. Retirado de: A.A.B.P, tese de mestrado, 2014...1

Figura 2: Sequência de aminoácidos da angiotensina-(1-7) e da alamandina...2

Figura 3: Alamandina promove aumento na produção de NO em cardiomiócitos.

A) Imagens representativas de cardiomiócitos adultos marcados com a sonda DAF-FM e tratados com ALA e ANG-(1-7) durante 15 minutos. B) Gráfico de barras mostra o aumento nos níveis de NO por meio da fluorescência do DAF-FM. CTR = Controle, ALA = alamandina e Ang-(1-7) = Angiotensina-(1-7). n = número de cardiomiócitos analisados em 6 experimentos independentes. * $p < 0,05$ quando comparado ao grupo controle...14

Figura 4: Tratamento agudo com alamandina não induz alteração na fosforilação na Akt.

A) Western-blots representativos da fosforilação da proteína Akt nos sítios Ser473 ou Thr308 em cardiomiócitos adultos tratados com alamandina ou angiotensina-(1-7) durante 5 minutos. B) Gráfico de barras com a média densitométrica referente a Akt fosforilada nos resíduos Ser473 e Thr308. O GAPDH foi utilizado como normalizador. CTR = Controle, ALA = Alamandina e ANG-(1-7) = Angiotensina-(1-7). n = número de experimentos independentes...16

Figura 5: Tratamento agudo com alamandina não induz alteração na fosforilação na Akt.

A) Western-blots representativos da fosforilação da proteína Akt nos sítios Ser473 ou pAkt (Thr308) em cardiomiócitos adultos tratados com alamandina ou angiotensina-(1-7) durante 15 minutos. B) Gráfico de barras com a média densitométrica referente a Akt fosforilada nos resíduos Ser473 ou Thr308. O GAPDH foi utilizado como normalizador. CTR = Controle, ALA = Alamandina e ANG-(1-7) = Angiotensina-(1-7). n = número de experimentos independentes...17

Figura 6: Tratamento agudo com alamandina promove aumento da fosforilação da AMPK α em cardiomiócitos. A) Western-blot representativo mostrando os níveis de fosforilação da pAMPK α (Thr172) em cardiomiócitos adultos. B) Gráfico de barras mostra a média da expressão da AMPK α fosforilada no resíduo Thr172. O GAPDH foi utilizado como normalizador. CTR = Controle, ALA 5' = células tratadas durante 5 minutos, ALA 15' = células tratadas durante 15 minutos. n = número de experimentos independentes. *p<0,05...18

Figura 7: Tratamento de cardiomiócitos com alamandina promove aumento na fosforilação da LKB1. A) Western-blot representativo mostrando os níveis de fosforilação da proteína pLKB1 (Ser428) em cardiomiócitos adultos. B) Gráfico de barras mostra a média da análise densitométrica dos níveis de fosforilação da LKB1 no resíduo Ser428. O GAPDH foi utilizado como normalizador. CTR = Controle, ALA 5' = células tratadas durante 5 minutos. n = número de experimentos independentes. *p<0,05...19

Figura 8: Alamandina promove aumento na produção de NO via AMPK α em cardiomiócitos. A) Imagens representativas de cardiomiócitos adultos marcados com a sonda DAF-FM e tratados com ALA e CC. B) Gráfico de barras da fluorescência do DAF-FM. CTR = Controle, ALA = Alamandina e ALA + CC = Alamandina + Composto C. n = número de cardiomiócitos analisados em 3 experimentos independentes. *p<0,05...20

Figura 9: O efeito da alamandina na fosforilação da LKB1 e da AMPK α está preservado em cardiomiócitos provenientes de camundongos MAS-KO. A) Western-blot representativo mostrando os níveis de fosforilação da proteína pLKB1 (Ser482) e gráfico de barras com a média da LKB1 fosforilada no resíduo Ser482. B) Western-blot representativo mostrando os níveis de fosforilação da proteína pAMPK α (Thr172) e gráfico de barras com a média da AMPK α fosforilada no resíduo Thr172. O GAPDH foi utilizado como normalizador. CTR = Controle, ALA 5' = células tratadas

durante 5 minutos, ALA 15' = células tratadas durante 15 minutos. n = número de experimentos independentes. *p<0,05...21

Figura 10: Alamandina induz aumento na produção de NO independentemente do receptor MAS. A) Imagens representativas de cardiomiócitos adultos isolados do animal MAS-KO marcados com a sonda DAF-FM e tratados com ALA. B) Gráfico de barras da fluorescência do DAF-FM. CTR = Controle, ALA = Alamandina. n = número de cardiomiócitos analisados em 4 experimentos independentes. *p<0,05...22

Figura 11: Efeito da alamandina na fosforilação da AMPK α é perdido em cardiomiócitos provenientes de camundongos MrgD-KO. A) Gráfico de barras com a média da fosforilação da AMPK α no resíduo Thr172. A AMPK α foi utilizada como normalizador. CTR = Controle, ALA 5' = células tratadas durante 5 minutos, ALA 15' = células tratadas durante 15 minutos. n = número de experimentos independentes...23

Figura 12: Alamandina induz aumento na produção de NO via MrgD em cardiomiócitos. A) Imagens representativas de cardiomiócitos adultos marcados com a sonda DAF-FM e tratados com ALA e D-Pro⁷. B) Gráfico de barras referente a fluorescência do DAF-FM. CTR = Controle, ALA = Alamandina e ALA + D-Pro⁷ = Alamandina + D-Pro⁷-Ang-(1-7). n = número de cardiomiócitos analisados em 2 experimentos independentes. *p<0,05...24

Figura 13: O efeito da alamandina sob a produção de NO é perdido em cardiomiócitos do animal MrgD-KO. A) Imagens representativas de cardiomiócitos adultos isolados do animal MrgD-KO marcados com a sonda DAF-FM e tratados com ALA. B) Gráfico de barras da fluorescência do DAF-FM. CTR = Controle, ALA = Alamandina. n = número de cardiomiócitos analisados em 4 experimentos independentes...25

Figura 14: Alamandina ativa a via LKB1/AMPK α em cardiomiócitos de animais com disfunção cardíaca. A e B) Superior - Western-blot representativo mostrando os níveis de fosforilação das proteínas AMPK α (Thr172) e pLKB1 (Ser482) em cardiomiócitos de ratos SD. Inferior - Gráficos de barras com a média da expressão da AMPK α Thr172 e LKB1 Ser482. B) Superior - Western-blot representativo mostrando os níveis de fosforilação das proteínas AMPK α (Thr172) e pLKB1 (Ser482) em cardiomiócitos de ratos TGR (mREN2) 27. Inferior - Gráficos de barras com a média da expressão da AMPK α Thr172 e LKB1 Ser482. O GAPDH foi utilizado como normalizador. CTR = Controle, ALA 5' = células tratadas durante 5 minutos, ALA 15' = células tratadas durante 15 minutos. n = número de experimentos independentes.

*p<0,05...26

Figura 15: Alamandina bloqueia o efeito da angiotensina II em cardiomiócitos neonatos. A) Imagens representativas de cardiomiócitos marcados com α -actinina (vermelho) e DAPI (azul). B) Gráfico em barras da análise da área celular. C) Gráfico em barras da expressão relativa do mRNA da MYH7. D) Gráfico em barras da expressão relativa do Ca^{2+} . CTR = controle, ANG II = angiotensina II, ALA = alamandina e ANG II + ALA = angiotensina II + alamandina. n = número de células analisadas de 5 experimentos independentes. *p<0,05...28

Figura 16: Alamandina promove fosforilação sustentada da AMPK α em cardiomiócitos neonatos. A) Western-blot representativo mostrando os níveis de fosforilação da AMPK α (Thr172) e AMPK α total em cardiomiócitos neonatos. B) Gráfico de barras mostra a média da expressão da AMPK α fosforilada no resíduo Thr172. A AMPK α foi utilizada como normalizador. CTR = Controle, 12 HS = células tratadas com alamandina durante 12 horas, 24 HS = células tratadas com alamandina durante 24 horas, 36HS = células tratadas com alamandina durante 36 horas. *p<0,05...29

Figura 17: Alamandina promove fosforilação transitória da Akt em cardiomiócitos neonatos. A) Gel representativo da expressão das proteínas pAkt (Ser473) e Akt em cardiomiócitos neonatos. B) Gráfico de barras mostra a média dos níveis de fosforilação da Akt fosforilada no resíduo Ser473. A Akt foi utilizada como normalizador. CTR = Controle, 12 HS = células tratadas com alamandina durante 12 horas, 24 HS = células tratadas com alamandina durante 24 horas, 36HS = células tratadas com alamandina durante 36 horas. *p<0,05...30

Figura 18: Efeito anti-hipertrófico da alamandina independe do receptor MAS. A) Imagens representativas de cardiomiócitos neonatos marcados com α -actinina (vermelho) e DAPI (azul) obtidas no microscópio confocal. B) Gráfico de barras mostra a média da área celular dos cinco grupos experimentais. CTR = Controle, ANG II = angiotensina II, ALA = alamandina, ANG II + ALA = angiotensina II + alamandina e ANG II + ALA + A-779 = angiotensina II + alamandina + A-779. *p<0,05 quando comparado aos outros grupos experimentais. n = número de células analisadas em 3 experimentos independentes...31

Figura 19: Alamandina promove efeito anti-hipertrófico via receptor MrgD em

cardiomiócitos neonatos. A) Imagens representativas de cardiomiócitos neonatos marcados com α -actinina (vermelho) e DAPI (azul) obtidas no microscópio confocal. B) Gráfico de barras mostra a média da área celular dos cinco grupos experimentais. CTR = Controle, ANG II = angiotensina II, ALA = alamandina, ANG II + ALA = angiotensina II + alamandina e ANG II + ALA + D-Pro⁷ = angiotensina II + alamandina + D-Pro⁷. * $p < 0,05$ quando comparados aos grupos controle, alamandina e Ang II + alamandina. n = número de células analisadas em 4 experimentos independentes...**32**

Figura 20: O NO está envolvido no efeito anti-hipertrófico da alamandina em cardiomiócitos neonatos. A) Imagens representativas de cardiomiócitos neonatos marcados com α -actina (vermelho) e DAPI (azul) obtidas no microscópio confocal. B) Gráfico de barras mostra a média da área celular dos seis grupos experimentais. CTR = Controle, ANG II = angiotensina II, ALA = alamandina, ANG II + ALA = angiotensina II + alamandina e ANG II + ALA + L-NAME = angiotensina II + alamandina + L-NAME. * $p < 0,05$ quando comparado aos grupos controle, alamandina e Ang II + alamandina. n = número de células analisadas em 4 experimentos independentes...**33**

Figura 21: A AMPK α participa do efeito anti-hipertrófico da alamandina em cardiomiocitos neonatos. A) Imagens representativas de cardiomiócitos neonatos marcados com α -actinina (vermelho) e DAPI (azul) obtidas no microscópio confocal. B) Gráfico de barras mostra a média da área celular dos cinco grupos experimentais. CTR = Controle, ANG II = angiotensina II, ALA = alamandina, ANG II + ALA = angiotensina II + alamandina e ANG II + ALA + CC = angiotensina II + alamandina + composto C. * $p < 0,05$ quando comparados aos grupos controle, alamandina e Ang II + alamandina. n = número de células analisadas em 3 experimentos independentes...**34**

LISTA DE ABREVIATURAS

μm^2 – micrometro quadrado

Akt – proteína quinase B ALA

– alamandina

ANG I – angiotensina I ANG

II – angiotensina II

ANG-(1-7) – angiotensina-(1-7)

ARA-C - cytosine-D-arabinofuranoside

AT1 – receptor de angiotensina II tipo I

AT2 – receptor de angiotensina II tipo II

CC – composto C

CHO – células de ovário de *hamsters* chineses

DAF-FM - 4-amino-5-methylamino-2',7'-difluorofluorescein diacetate

DAPI - 4,6-diamidino-2-phenylindole

D-PRO⁷ - D-Pro⁷-angiotensina-(1-7)

ECA – enzima conversora de angiotensina

ECA2 – enzima conversora de angiotensina 2

eNOS – óxido nítrico endotelial

GAPDH – gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase HBSS

– solução balanceada de Hank's

HC – hipertrofia cardíaca

HP β CD - hidroxipropil- β -ciclodextrina

iNOS – óxido nítrico sinatse induzível

L-NAME – Nitro-L-Arginina Metil Éster Hidrocloroeto

MAS-KO – animal nocaute para o receptor MAS

MrgD - receptor acoplado à proteína G relacionado ao MAS – tipo D

NEP - endopeptidase neutra

nNOS - óxido nítrico sintase neuronal NO –

óxido nítrico

NOS – óxido nítrico sintase PBS –

tampão fosfato salina PCP - prolil-

carboxipeptidase PEP - prolil-

endopeptidase PFA –

paraformaldeído

PI3K - fosfatidilinositol 3 quinase Ser

– serina

SHR – rato espontaneamente hipertenso

SRA – sistema renina angiotensina

Thr – treonina

RESUMO

O sistema renina angiotensina é constituído por uma série de peptídeos, enzimas e receptores que são responsáveis pelo controle da função renal e cardiovascular. Nos últimos anos este sistema tem passado por uma série de modificações. A alamandina é um novo heptapeptídeo deste sistema, formado a partir da angiotensina A ou da angiotensina-(1-7), que possui várias funções biológicas inclusive no coração. Embora já exista um conhecimento gerado acerca das funções deste novo peptídeo, ainda não se sabe por quais vias intracelulares estes efeitos são desenvolvidos. Logo, este trabalho teve como principal objetivo descrever uma via de sinalização intracelular desencadeada pela alamandina em cardiomiócitos de modelos animais saudáveis e com hipertensão arterial, além de investigar o papel da alamandina frente à angiotensina II em cardiomiócitos neonatos. Nossos resultados mostram que a alamandina induz a produção de óxido nítrico (NO) em cardiomiócitos adultos, acompanhado do aumento na fosforilação da AMPK α e LKB1. Este aumento na produção de NO em resposta a alamandina foi observado em cardiomiócitos de animais nocautes para o receptor MAS, sendo ausente em cardiomiócitos de animais nocautes para o receptor MrgD e em miócitos cardíacos de animais selvagens tratados

com o D-PRO⁷. Ao inibirmos a AMPK α , observamos que a alamandina não apresentou

efeito sobre a produção de NO em cardiomiócitos. Em miócitos cardíacos isolados de animais com hipertensão arterial, observamos que a alamandina também ativou a via LKB1/AMPK α . Em cardiomiócitos neonatos, a alamandina foi capaz de exercer efeito anti-hipertrófico frente ao estímulo da angiotensina II. O efeito anti-hipertrófico da alamandina em células tratadas com Ang II foi bloqueado na presença do antagonista do receptor MrgD, do inibidor das óxido nítrico sintases e do inibidor da AMPK α . Desta forma, concluímos que a alamandina exerce seus efeitos em miócitos cardíacos por meio da via MrgD/AMPK α /NO. Em conjunto estes dados apontam um importante papel da alamandina no coração e sugerem um importante papel terapêutico.

Palavras-chaves: cardiomiócitos, alamandina, óxido nítrico, angiotensina II.

ABSTRACT

The renin angiotensin system consists of a series of peptides, enzymes and receptors that are responsible for the control of renal and cardiovascular function. In recent years, this system has undergone a number of modifications with the discovery of new members. Alamandine is a heptapeptide recently characterized that can be formed from angiotensin A or angiotensin- (1-7), which presents various biological functions including in the heart. Although there is already a generated knowledge about functions of this new peptide, it is not known by which intracellular pathways these effects are developed. Therefore, in this research our goal was to investigate the intracellular signaling pathways triggered by alamandine in cardiomyocytes from healthy and hypertensive animal models. Additionally, we aimed to investigate whether alamandine is able to protect neonatal rat cardiomyocytes against angiotensin II hypertrophic effects. The results show that alamandine induces the production of nitric oxide (NO) in adult cardiomyocytes, and this effects occurs in parallel with increases in phosphorylation of LKB1 and AMPK α . This NO raise induced by alamandine was observed in cardiomyocytes from MAS knockout mice, and it was abolished in cardiomyocytes from MrgD knockout mice or in cells treated with D-PRO⁷. When AMPK α was inhibited, alamandine induced NO production in cardiomyocytes was abolished. In isolated cardiac myocytes from an animal model of hypertension, alamandine also activated LKB1/AMPK α . In neonatal cardiomyocytes, alamandine was able to exert an anti-hypertrophic effect in Ang II treated cells. The anti-hypertrophic effect of alamandine in cells treated with Ang II was blocked in the presence of MrgD receptor antagonist, or in the presence of nitric oxide synthase inhibitor. Moreover we found that AMPK α inhibitor, Compound C was also effective on blocking alamandine protective signaling against Ang II. Thus, these data infer that the alamandine exerts its effects in cardiac myocytes via MrgD/AMPK α /NO signaling pathway. Taken together, our data indicate an important role of alamandine, and highlights its therapeutic potential.

Key words: cardiomyocytes, alamandine, nitric oxide, angiotensin II.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO...1

2. REVISÃO DA LITERATURA...2

2.1 O Sistema Renina Angiotensina Clássico...2

2.2 O Novo Sistema Renina Angiotensina...3

2.3 Alamandina...4

3. OBJETIVOS...7

3.1 Objetivo Geral...7

3.1 Objetivos Específicos...7

4. MATERIAIS E MÉTODOS...8

4.1 Animais...8

4.2 Peptídeos...8

4.3 Isolamento de Miócito Ventricular de Animais Adultos...8

4.4 Cultura de Cardiomiócitos Neonatais...9

4.5 Incubações dos Cardiomiócitos Neonatais em Cultura...10

4.6 Avaliação da Produção de NO...10

4.7 Western Blotting...11

4.8 Imunofluorescência...12

4.9 Expressão Relativa de Genes...12

4.10 Análise Estatística...13

5. RESULTADOS...14

5.1 Alamandina aumenta a produção de NO em cardiomiócitos ventriculares adultos...14

5.2 Alamandina não altera a fosforilação da Akt em cardiomiócitos ventriculares...15

1.1	Alamandina induz aumento na fosforilação da AMPK α em cardiomiócitos ventriculares...	17
5.4	Alamandina aumenta a fosforilação da LKB1 em cardiomiócitos ventriculares...	18
5.5	Alamandina induz aumento na produção de NO em cardiomiócitos via AMPK α ...	19
5.6	Alamandina ativa a via LKB1/AMPK α /NO em cardiomiócitos ventriculares independentemente do receptor MAS...	20
5.7	Alamandina ativa a AMPK α via receptor MrgD em cardiomiócitos ventriculares...	22
5.8	Alamandina aumenta a produção de NO via MrgD...	23
5.9	Alamandina ativa a AMPK α em cardiomiócitos ventriculares de animais hipertensos...	25
5.10	Alamandina previne a hipertrofia celular induzida pela Ang II...	27
2	DISCUSSÃO ...	35
3	CONCLUSÃO ...	36
4	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS ...	37

1. INTRODUÇÃO

As doenças cardiovasculares representam um grande problema de saúde pública, pois são as principais causas de mortes no mundo (Lloyd-Jones *et al.*, 2010). Em resposta ao estresse hemodinâmico, o coração passa por um processo de remodelamento, que é acompanhado por hipertrofia cardíaca (HC). A HC é uma complicação comum da hipertensão arterial, e é reconhecida como sendo um fator de risco para o desenvolvimento da insuficiência cardíaca congestiva. Embora a HC inicialmente mantenha a função cardíaca, uma sustentada sobrecarga hemodinâmica causa a transição da hipertrofia compensatória para a insuficiência cardíaca, caracterizada por dilatação da câmara, disfunção contrátil progressiva e morte súbita (Parekh, 2011).

Neste contexto, estudos experimentais em sistemas de cultura de cardiomiócitos, modelos animais e estudos clínicos, mostram que o sistema renina angiotensina (SRA), mais especificamente o eixo ECA/Ang II/AT1, está envolvido na progressão da patofisiologia da hipertrofia e insuficiência cardíaca. Está hipótese é sustentada por quatro motivos principais, que são eles: (i) a Angio II é produzida no cardiomiócito, (ii) o SRA é ativado na hipertrofia e na insuficiência cardíaca, (iii) a Angio II promove o crescimento *in vitro* dos cardiomiócitos e (iv) bloqueadores farmacológicos do SRA são altamente eficazes no tratamento da insuficiência cardíaca em modelos animais e em humanos (Drexler e Wollert, 1999; Wenzel e Schlüter, 2008).

Nas últimas décadas vários novos componentes do SRA foram descobertos e o seu papel caracterizado. Dentre estes novos componentes destacam-se: enzima conversora de angiotensina 2 (ECA2) (Donoghue *et al.*, 2000), receptor de pró(renina) (Nguyen *et al.*, 2002) e alamandina (Lautner *et al.*, 2013). A alamandina (ALA) é um novo peptídeo deste sistema, e apresenta similaridade estrutural com a angiotensina-(1-7) (Ang-(1-7)). No cardiomiócito, as vias de sinalização envolvidas nas ações da ALA ainda não foram caracterizadas. Logo, o desenvolvimento deste trabalho foi justificado pelo fato de ser o primeiro a propor o mecanismo celular de ação deste novo, tendo como alvo células cardíacas, provenientes de modelos animais saudáveis e doente.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 O Sistema Renina Angiotensina Clássico

O SRA apresenta um papel vital na regulação de processos fisiológicos do sistema cardiovascular e renal, funcionando não só como um sistema endócrino, mas também com funções parácrina e autócrina nos tecidos e órgãos (Mehta e Griendling, 2007). Este sistema é composto pelo Angiotensinogênio, uma α -glicoproteína produzida principalmente pelo fígado e secretada na corrente sanguínea. Esta é clivada pela renina, uma protease produzida nos rins e secretada por células justaglomerulares da arteríola aferente, produzindo Angiotensina I (Ang I), um decapeptídeo biologicamente inativo.

Posteriormente, a Ang I é clivada pela Enzima Conversora de Angiotensina (ECA), em Ang II. A Ang II, peptídeo classicamente conhecido deste sistema, promove ações hipertensivas nos diferentes sistemas fisiológicos. As ações deste peptídeo são mediadas pelos receptores AT_1 e AT_2 , os quais são receptores de sete domínios transmembrana acoplados à proteína G, e produzem efeitos opostos.

O receptor AT_1 encontra-se principalmente no sistema cardiovascular e neuroendócrino. Via este receptor, a Ang II contribui diretamente para os efeitos deletérios no remodelamento cardíaco, tendo papel importante no processo de hipertrofia, arritmias e fibrose cardíaca (Balakumar e Jagadeesh, 2014). No estudo de Paradis et al., 2000, animais transgênicos que superexpressam este receptor no coração, exibiram uma grande hipertrofia cardíaca, acompanhada de uma extensa fibrose. Além disto, a Ang II via AT_1 promove retenção de sódio e água, e liberação de aldosterona pelas glândulas adrenais.

O receptor AT_2 é encontrado durante todo o desenvolvimento do indivíduo. A ativação deste receptor promove vasodilatação, inibição da proliferação celular induzida pela estimulação dos receptores AT_1 e inibição da apoptose celular (Tsutsumi et al, 1999; Jones et al., 2008). O efeito da Ang II via este receptor, parece ser mediado

pela formação de cininas, óxido nítrico (NO) e guanosina monofosfato cíclico (GMPc) (Tsutsumi *et al*, 1999).

2.2 O Novo Sistema Renina Angiotensina

O SRA tem sido modificado nos últimos anos. Além dos componentes classicamente conhecidos e descritos anteriormente, novas enzimas, novos peptídeos e novos receptores tornaram-se parte do SRA. A caracterização da função destes novos componentes mostrou a importância vital destes para o funcionamento em equilíbrio do sistema. Na figura 1 encontra-se um esquema com a maioria dos componentes do SRA descritos e algum dos seus efeitos.

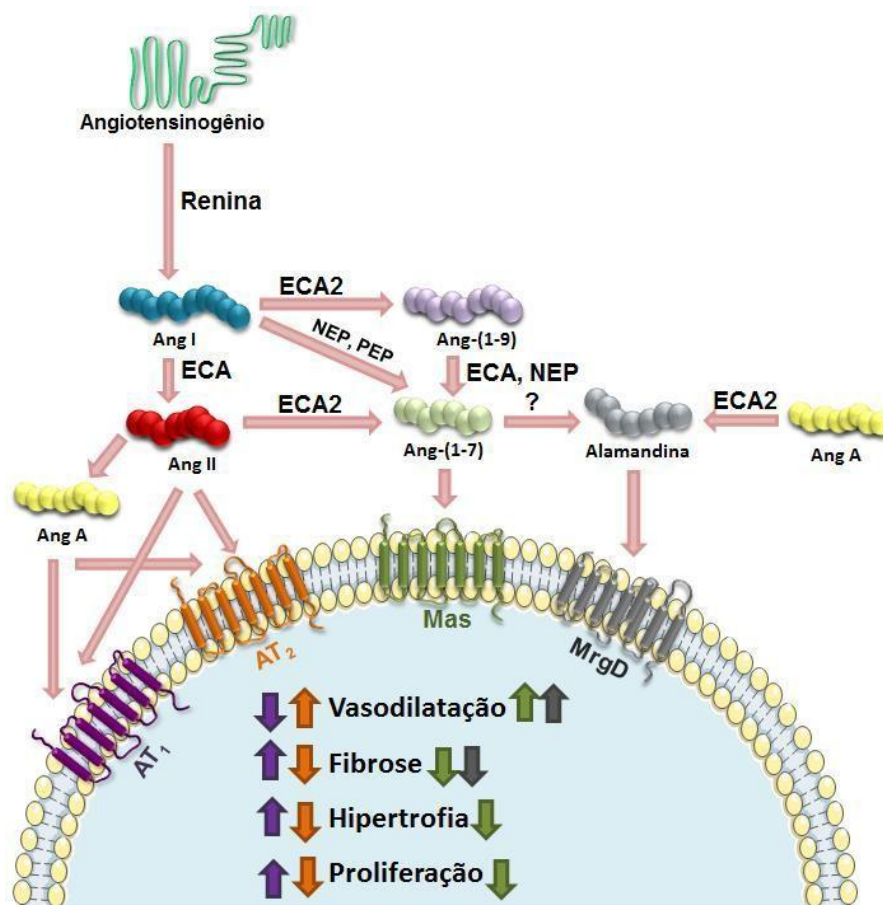


Figura 1: Sistema Renina-Angiotensina. Ang: Angiotensina; AT1: Receptor da Ang II tipo 1; AT2: Receptor da Ang II tipo 2; ECA: Enzima conversora de angiotensina; ECA2: Enzima conversora de angiotensina 2; Mas: Receptor da Ang-(1-7), MrgD: Receptor acoplado a proteína G relacionado ao Mas tipo - D; NEP: Endopeptidase neutra; PEP: Prolil-endopeptidase. Retirado de: A.A.B.P, tese de mestrado, 2014.

Dentre os novos peptídeos descobertos recentemente, destaca-se a angiotensina-(1-7). A Ang-(1-7) é um heptapeptídeo que pode ser formado a partir da Angiotensina II de forma dependente ou independente da ECA2. Além desta via, a Ang-(1-7) pode ser formada pela ação proilil-endopeptidase (PEP), endopeptidase neutra (NEP) ou a partir da Ang II pela ação da PEP e proilil-carboxipeptidase (PCP) (Santos et al., 2000; Welches et al., 1993).

A Ang-(1-7) desenvolve ações opostas da Ang II e por isso tem sido descrita como peptídeo contra regulatório ao eixo ECA/Ang II/AT1. Este peptídeo é capaz de promover vasodilatação, anti-arritmogênese, anti-fibrogênese, efeitos anti-proliferativos e anti-angiogênicos. Estas ações são desenvolvidas quando o peptídeo se liga ao seu receptor específico, o MAS. O MAS é um receptor com sete domínios transmembranares acoplado à proteína G. É expresso no cérebro, testículos, células endoteliais, cardiomiócitos, entre outros tecidos e células.

A cascata intracelular fosfatidilinositol 3 quinase/ proteína quinase B (PI3K/Akt) está envolvida na maioria das ações desenvolvidas pela Ang-(1-7). A Akt é uma quinase que entre outras proteínas, fosforila e aumenta atividade da óxido nítrico endotelial (eNOS) e conseqüentemente aumenta a produção de óxido nítrico (NO). O efeito anti-hipertrofico apresentado pela Ang-(1-7) tem sido atribuído, em grande parte, a capacidade deste peptídeo em aumentar a produção de NO diretamente nos cardiomiócitos (Dias-Peixoto et al., 2008, Gomes et. al., 2010). O NO é uma importante molécula sinalizadora capaz de modular proteínas e sinalizadores intracelulares envolvidos na progressão da hipertrofia cardíaca. Além disto, Dias-Peixoto et al., 2008, descreveu que camundongos com deleção genética do receptor MAS (MAS-KO), apresentam alteração na expressão de proteínas envolvidas na produção de NO, como a caveolina-3, HSP-90 e da própria Akt, comprovando assim a importância do NO no desenvolvimento dos efeitos da Ang-(1-7) via receptor MAS.

2.3 Alamandina

No ano de 2013, Lautner et al., descreveram e caracterizaram um novo peptídeo do SRA, a alamandina. A ALA também é um heptapeptídeo que apresenta alta

semelhança estrutural com a Ang-(1-7). A diferença entre estes dois peptídeos está somente na presença de um resíduo de alanina na estrutura da alamandina, no lugar de um resíduo de aspartato presente na Ang-(1-7) (figura 2).



Figura 2: Sequência de aminoácidos da angiotensina-(1-7) e da alamandina.

A ALA pode ser formada pela ação da ECA2 sobre a Angiotensina A ou diretamente da angiotensina-(1-7). Interessantemente, corações de ratos perfundidos com Ang-(1-7) apresentaram produção de alamandina a qual foi monitorada por espectrometria de massa, mostrando desta forma que o coração é um órgão que apresenta toda maquinaria necessária para produção da alamandina. Além disto, os mesmos autores confirmaram que a ALA é um peptídeo endógeno do coração.

Lautner *et al.*, 2013, também descreveram alguns importantes efeitos da ALA. Assim como a Ang-(1-7) a ALA promove vasodilatação de aorta de camundongos, um efeito dependente da presença de endotélio, que é prevenido na presença do L-NAME, um bloqueador inespecífico da óxido nítrico sintase (NOS). Avançando no mecanismo deste efeito, os autores observaram que aorta de camundongos MAS-KO quando estimulados com alamandina, também apresentaram vasodilatação, excluindo desta forma a participação do receptor MAS neste efeito da ALA. O mesmo foi observado quando aorta de camundongos selvagens foram estimulados com a alamandina na presença do antagonista do receptor MAS, o A-779. Diante destes resultados, os autores descrevem que a vasodilatação induzida pela ALA é prevenida quando se é

usado o D-Pro⁷-Ang-(1-7), um antagonista do receptor MAS e do receptor MrgD. O MrgD também é um receptor acoplado à proteína G relacionado ao MAS – tipo D. A ligação da alamandina ao MrgD foi confirmada por experimentos de imunofluorescência em células de ovário de *hamsters* chineses (CHO) transfectadas com o MrgD. Desta forma os autores concluíram que a alamandina apresenta como receptor, o MrgD.

Um dado importante, do ponto de vista clínico, é que a alamandina incluída na hidroxipropil- β -ciclodextrina, quando administrada oralmente em ratos espontaneamente hipertensos (SHR) é capaz de reduzir a pressão arterial destes animais. Além disso, em modelo de hipertrofia cardíaca induzida pelo isoproterenol, o complexo ALA/HP β CD diminuiu a presença de colágeno tipo I, III e fibronectina, mostrando desta forma que o coração é um alvo deste novo peptídeo (Lautner *et al.*, 2013).

Além do trabalho desenvolvido por Lautner *et al.*, 2013, o único, até então, descrevendo as ações da alamandina via MrgD, Habiyaqare *et al.*, 2014 descreveram a presença do MrgD e da eNOS em aortas de coelhos saudáveis e com aterosclerose. Em aorta torácica e ilíaca de coelhos saudáveis a ALA promoveu vasodilatação, porém, em vasos de animais com aterosclerose este efeito não foi observado.

Apesar de todo o conhecimento já gerado sobre a alamandina, nenhum trabalho investigou a via intracelular desencadeada por este novo peptídeo. Sendo assim, este trabalho descreve um importante mecanismo de ação desencadeado pela alamandina em cardiomiócitos, tanto de animais saudáveis, quanto em modelo de hipertensão arterial. Além disto, investigamos o efeito da ALA na presença da Ang II em cultura de cardiomiócitos neonatais.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo Geral

Caracterizar as vias de sinalização ativadas pela alamandina em cardiomiócitos e seu efeito anti-hipertrófico *in vitro*.

3.2. Objetivos Específicos

i) Avaliar a produção de NO mediada pela alamandina em cardiomiócito ventricular.

ii) Caracterizar as vias de sinalização envolvidas no efeito da alamandina sobre a produção de NO.

iii) Avaliar se a alamandina é capaz de prevenir o efeito hipertrófico da Angiotensina II.

iv) Caracterizar as vias de sinalização envolvidas no efeito anti-hipertrófico da alamandina em cardiomiócitos.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Animais

Para a realização dos experimentos deste trabalho foram utilizados: (i) camundongos C57/BL6, (ii) ratos Wistar neonatos (1-3 dias), ambos provenientes do Centro de Bioterismo (CEBIO) do Instituto de Ciências Biológicas da UFMG, (iii) camundongos com deleção genética do receptor Mas ($Mas^{-/-}$) e do receptor MrgD ($MrgD^{-/-}$), (iv) ratos Sprague-Dawley, e (v) ratos que superexpressão a renina – TGR (mREN2) 27, cedidos pelo Laboratório de Hipertensão – ICB/UFMG. Todos os animais são machos e apresentam entre 10-12 semanas de idade. Os animais foram mantidos num ciclo luminoso de 12 h (12 h de claridade, 12 h de escuro), recebendo água e comida *ad libitum*.

4.2. Peptídeos

Os peptídeos utilizados neste estudo foram fornecidos pelo professor Dr. Robson A. S. Santos do Laboratório de Hipertensão – ICB/UFMG.

4.3. Isolamento de miócito ventricular de animais adultos

Cardiomiócitos de ratos e camundongos adultos foram isolados de acordo com a metodologia previamente descrita por Guatimosim *et al.*, 2001. Resumidamente, o coração foi rapidamente removido e retro-perfundido via método de Langendorff com solução de Tyrode modificada livre de Ca^{2+} (em mmol/L: NaCl, 130; KCl, 5,4; HEPES, 25; $MgCl_2$, 0,5; NaH_2PO_4 , 0,33; glicose, 22 e insulina 100U/mL; pH=7,40). Posteriormente, o coração foi perfundido com solução de Tyrode contendo 50 μ mol/L de $CaCl_2$ e colagenase (tipo 2 – 1 mg/mL). Após a etapa de digestão enzimática, o órgão foi submetido à digestão mecânica e filtrado para remoção do tecido não digerido. A concentração extracelular de Ca^{2+} foi aumentada após três ciclos de centrifugação e troca de tampão, chegando a 500 μ mol/L ao final do processo. Logo após, as células foram novamente centrifugadas e mantidas em solução de Tyrode. As células isoladas foram divididas em dois grupos experimentais: um grupo de célula foi tratada durante 5 ou 15 minutos com alamandina (100 nmol/L) e após este tempo foi

realizado extração de proteínas para experimentos de western blot. Um outro grupo de célula foi tratado com alamandina (100 nmol/L) durante 15 minutos, e após este período as células foram marcadas com uma sonda sensível ao óxido nítrico (DAF-FM) durante 30 minutos. Logo após a marcação com o DAF-FM, a fluorescência das células foi capturada num microscópio confocal Zeiss LSM 510 Meta (CAPI, ICB, UFMG).

4.4. Cultura de cardiomiócitos neonatais

Cardiomiócitos neonatais foram isolados de acordo com metodologia previamente descrita por Guatimosim *et al.*, 2008. No dia 0, os animais foram esterilizados com solução de etanol 70% e decapitados. A retirada do coração ocorreu em seguida e o órgão foi alocado em solução gelada de HBSS (*Hank's Buffered Salt Solution*), livre de Ca^{2+} e Mg^{2+} , contida numa placa de seis poços sobre o gelo. Foram realizados sucessivos cortes no tecido visando não só a redução do tamanho do órgão como também a remoção das hemácias. Os pedaços de tecido foram transferidos com o auxílio de uma pinça por todos os poços para lavagem adequada. A digestão com tripsina (0,5 mg/mL em HBSS) ocorreu sob agitação a 2-8°C *overnight* (16-20 horas) em um tubo de centrifuga de 50 mL devidamente vedado. Após o período de tripsinização (dia 1), as células foram tratadas com inibidor de tripsina (1-2 mg por preparação) e posteriormente submetidas à digestão com colagenase (5 mg por preparação, diluídos em 5 mL de meio L-15) por 40 minutos à temperatura ambiente, sob agitação constante. Procedeu-se à digestão mecânica utilizando uma pipeta automática de transferência e uma ponteira de 10 mL para fazer refluxo. O preparado foi filtrado para a remoção do tecido não digerido (membrana de 70 µM) e deixado em repouso por 40 minutos à temperatura ambiente. O material celular foi centrifugado a 50 – 100 x g por 5 minutos. O sobrenadante foi descartado e o pelete, onde estão os cardiomiócitos, foi ressuspensionado no volume desejado de meio M199, suplementado com penicilina/estreptomicina (100 U/mL e 100 µg/mL, respectivamente), 10% de FBS (do inglês, *Fetal Bovine Serum*), 2,2 g de NaHCO_3 e 2 mmol/L de L-glutamina. Após a ressuspensão do material centrifugado, foi realizado o pré-plaqueamento das células em frascos (garrafas) de cultura T-75, por aproximadamente duas horas em estufa de CO_2 , temperatura 37°C, objetivando a aderência dos fibroblastos ao plástico. Em

seguida, o material em suspensão foi recolhido e devidamente plaqueado em superfície previamente tratada com fibronectina, neste caso, placas de seis poços e garrafas T25, próprias para cultivo celular.

As placas de cultura foram mantidas na estufa de CO₂, temperatura 37°C, por 16-20 horas para a aderência dos cardiomiócitos. Cumprido esse período, foi adicionado ao meio ARA-C (cytosine-D-arabinofuranoside) (concentração final de 20 µg/mL) por 48 horas para impedir o crescimento e divisão de fibroblastos remanescentes. Após o tratamento com ARA-C, no dia 4, os poços foram lavados por três vezes com meio sem soro para remover os *debris* celulares e o ARA-C remanescentes. Logo após, foi realizado o tratamento dos cardiomiócitos com os peptídeos e inibidores de interesse.

4.5. Incubações dos cardiomiócitos neonatais em cultura

Os cardiomiócitos neonatais foram tratados por 36 horas com alamandina (ALA) (100 nmol/L), angiotensina II (ANGIO II) (100 nmol/L), D-Pro⁷-angiotensina-(1-7) (D-PRO⁷) (1 µmol/L) e A-779 (1 µmol/L). Em alguns experimentos foi utilizado o Composto C (10 µmol/L) e o L-NAME (10 µmol/L). Os peptídeos foram adicionados sozinhos ou em conjunto com os antagonistas e inibidores.

4.6. Avaliação da produção de NO

Cardiomiócitos neonatais mantidos em cultura e cardiomiócitos adultos tratados com os peptídeos e inibidores citados acima, foram utilizados neste experimento. A avaliação da produção de NO foi realizada através de uma sonda fluorescente permeável a membrana e sensível ao NO, o DAF-FM diacetate (4-amino-5-methylamino-2',7'-difluorofluorescein diacetate) (Invitrogen). Os cardiomiócitos mantidos em Tyrode foram marcados com o DAF-FM, 5 µmol/L, durante 30 minutos, a 37°C e protegidos da luz. Após este período, foram realizadas sucessivas lavagens, num período de 30 minutos, com o intuito de diminuir o excesso de marcação. Por fim, a fluorescência gerada pela produção de NO foi detectada utilizando o microscópio confocal Zeiss LSM 510 Meta (CAPI, ICB, UFMG). A análise de fluorescência foi realizada usando o software ImageJ.

4.7. Western Blotting

Cardiomiócitos neonatos e adultos foram macerados por 40 minutos em tampão de lise (em mM: NaCl, 100; Tris-base, 50; EDTA-2Na, 5; Na₄P₂O₇·10H₂O, 50; MgCl₂, 1; pH 8,0) com detergentes (Nonidet P40 1%, Triton x-100 0,3% e deoxicolato de sódio 0,5%), contendo inibidores de protease (PMSF 200 mM; benzamidina 15,7 mg/mL; pepstatina 10 mM; aprotinina 10 mg/mL) e inibidores de fosfatase (em mM: NaF, 20; Na₃VO₄, 1). Ao fim do procedimento, procedeu-se a centrifugação do material (12 minutos, 8000 rpm, 4°C), coleta do sobrenadante e acondicionamento em freezer -80°C para posterior uso. As proteínas foram quantificadas de acordo com o método descrito por Bradford, 1976.

40-50 µg de proteínas foram separadas num gel de poliacrilamida cuja concentração variou entre 10 e 12% dependendo da massa molecular da proteína-alvo. As amostras foram aquecidas a 95°C por 5 minutos. As corridas foram realizadas com voltagem fixa em 120V e tempo máximo de 2 horas. A transferência foi realizada utilizando-se o aparato de transferência *semi-dry* (BioRad), com voltagem fixa em 20V e tempo de transferência variando entre 25 e 30 minutos. Todas as membranas foram coradas em solução de *Ponceau* para monitorar a qualidade da transferência. Logo após, as membranas foram lavadas em solução de TBS-T (do inglês, *Tris-Buffered Saline*; em mmol/L: NaCl, 150; Tris, 25 e 0,05% de Tween 20, pH 8,0). O bloqueio foi realizado em solução de TBS-T com leite a 5% por 1 hora a temperatura ambiente. As membranas foram incubadas por 16 a 20 horas, a 4°C, com anticorpo primário diluído em solução de leite 1% em TBS-T. Os seguintes anticorpos foram utilizados: anti-Akt fosforilada (Ser473) (1:1000, Cell Signaling), anti-Akt fosforilada (Thr308) (1:1000, Cell Signaling), anti-AMPKα fosforilada (Thr172) (1:1000, Cell Signaling), anti-LKB1 fosforilada (Ser482) (1:1000, Cell Signaling) e anti-GAPDH (1:3000, Santa Cruz). Após a incubação com o anticorpo primário, as membranas foram lavadas com TBS-T por 30 minutos (6 vezes de 5 minutos) e incubadas com o anticorpo secundário adequado conjugado a peroxidase (HRP) por 1 hora. Foram utilizados os seguintes anticorpos secundários: anti-coelho (1:15000, Sigma-Aldrich), anti-camundongo (1:15000, Sigma-Aldrich) e anti-cabra (1:10000, Sigma-Aldrich). Após este período, as membranas foram

novamente lavadas com TBS-T por 30 minutos (6 vezes de 5 minutos). As bandas foram detectadas por reação de quimioluminescência utilizando o reagente ECL Plus® e analisadas no Image Quant TL®. Foram utilizados o GAPDH e a expressão total da proteína como normalizador da expressão protéica.

4.8. Imunofluorescência

Os cardiomiócitos neonatos foram fixados com solução 4% de paraformaldeído (PFA) diluído em PBS 1x, por 15 minutos à temperatura ambiente. Logo após, procedeu-se à lavagem para remoção do PFA e permeabilização da membrana celular utilizando solução de PBS/Triton 0,5%. Após o bloqueio por 1 hora, os cardiomiócitos foram incubados *overnight* a 4°C com o anticorpo anti- α -actina (Sigma Aldrich, 1:150). As células foram incubadas com o anticorpo secundário conjugado ao Alexa Fluo 633 (1:500, Invitrogen) por 1 hora a 4°C. Após a incubação com o anticorpo primário e após a incubação com o secundário, as lâminas foram lavadas por 30 minutos com PBS 1x (6 vezes de 5 minutos). A marcação nuclear foi obtida incubando as células com 4,6-diamidino-2-phenylindole (DAPI, 1 mg/mL, 1:25). A área celular foi calculada com base na marcação com α -actinina.

As lâminas foram observadas usando o microscópio confocal Zeiss LSM 510 Meta (CAPI, ICB, UFMG). A análise da fluorescência foi realizada usando o software ImageJ e a medida da área celular foi avaliada utilizando o software LSM Image Browser da Zeiss.

4.9. Expressão relativa de genes

A extração do RNA foi realizada utilizando o TRIzol®, de acordo com as especificações do fabricante. Foi adicionado TRIzol® aos cardiomiócitos de ratos neonatos em cultura à temperatura ambiente. Para a separação das fases e precipitação do RNA foram utilizados, respectivamente clorofórmio e álcool isopropílico. O RNA foi lavado com etanol 75%. Após a secagem do pelete, o mesmo foi ressuscitado em água tratada DEPC (Diethylpyrocarbonate), livre de RNase. A dosagem da concentração de RNA total extraído foi realizada por meio do aparelho NanoVue Plus, GE Healthcare®.

0,5-2µg de RNA total foi utilizado na síntese do cDNA utilizando o kit de síntese de fita de cDNA da Fermentas® (First Strand cDNA Synthesis Kit) ou da Promega® (M-MLV Reverse Transcriptase) de acordo com as especificações do fabricante. Para amplificação do RNA mensageiro, foi usado o primer Oligo(dT)₁₈, que inicia a síntese de cDNA a partir da cauda poli-A presente na extremidade 3' do RNA mensageiro de eucariotos.

Os experimentos de PCR em tempo real foram realizados utilizando metodologia previamente descrita (Gomes *et al.*, 2010; Ladeira *et al.*, 2010; Lara *et al.*, 2010). Para a reação de quantificação, foi utilizado o reagente Maxima SYBR Green/ROX qPCR Master Mix (2x). Foi utilizado como controle, a expressão do S26. Em todos os experimentos, foi realizado um controle negativo sem adição de amostra. A expressão gênica foi calculada com base no valor $2^{-\Delta\Delta Ct}$, de acordo com a metodologia descrita por (Medhurst *et al.*, 2000).

4.10. Análise estatística

Os resultados foram analisados quanto à sua significância por meio do teste *One-Way ANOVA* seguido do teste de *Newman-Keuls* e em alguns experimentos utilizamos o teste-*t* Student, sendo considerados significativos quando * $p < 0,05$ e apresentados como média +/- erro médio padrão.

5. RESULTADOS

5.1. Alamandina aumenta a produção de NO em cardiomiócitos ventriculares adultos

Devido à similaridade estrutural entre a alamandina e angiotensina-(1-7), o primeiro objetivo deste trabalho foi a avaliar o efeito da alamandina sobre a produção de NO, um dos principais mediadores do efeito anti-hipertrófico da angiotensina-(1-7) em células cardíacas. Para isto, miócitos ventriculares de camundongos selvagens (C57BL/6) foram marcados com a sonda sensível ao NO (DAF-FM, 5 μ M), durante 30 minutos e posteriormente tratados com alamandina (100 nmol/L) por 15 minutos. Como observado na figura 3, a alamandina aumentou a produção de NO em cardiomiócitos ventriculares (+28%, $p < 0,05$) e, como observado anteriormente, a angiotensina-(1-7) também promoveu aumento da produção de NO nestas células (+18%, $p < 0,05$).

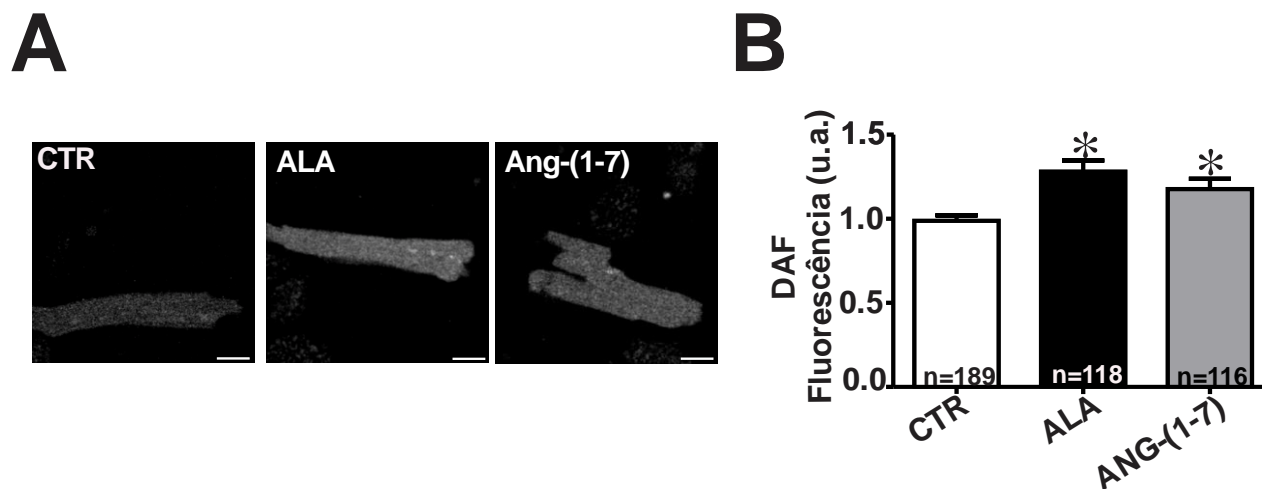


Figura 3: Alamandina promove aumento na produção de NO em cardiomiócitos. A) Imagens representativas de cardiomiócitos adultos marcados com a sonda DAF-FM e tratados com ALA e ANG-(1-7) durante 15 minutos. B) Gráfico de barras mostra o aumento nos níveis de NO por meio da fluorescência do DAF-FM. CTR = Controle, ALA = alamandina e Ang-(1-7) = Angiotensina-(1-7). n = número de cardiomiócitos analisados em 6 experimentos independentes. * $p < 0,05$ quando comparado ao grupo controle.

5.2. Alamandina não altera a fosforilação da Akt em cardiomiócitos ventriculares

Anteriormente, nosso grupo descreveu que o eixo Ang-(1-7)/MAS modula a produção de NO por meio da ativação da Akt em cardiomiócitos (Dias-Peixoto et al., 2008). Com o objetivo de avaliar o nível de fosforilação da Akt nos seus dois principais sítios regulatórios (Ser473 e Thr308), cardiomiócitos de camundongos selvagens (C57BL/6) foram tratados com alamandina ou angiotensina-(1-7) (100nmol/L) durante 5 ou 15 minutos. Após este período, western blots para estas proteínas foram realizados. A figura 4 mostra os dados obtidos com o tratamento de 5 minutos. Neste tempo não observamos alteração nos níveis de fosforilação da Akt tanto no sítio da Ser473, quanto na Thr308 nos cardiomiócitos expostos a ALA ou Ang-(1-7). Após 15 minutos de tratamento a Ang-(1-7) aumentou a fosforilação da pAkt(Ser473) (+45%, $p < 0,05$), enquanto o tratamento com a ALA não alterou a fosforilação desta proteína no sítio Ser473. Por sua vez, também não foi observada alteração nos níveis de fosforilação da pAkt no sítio Thr308, após 15 minutos de tratamento com a ALA ou Ang-(1-7) (figura 5).

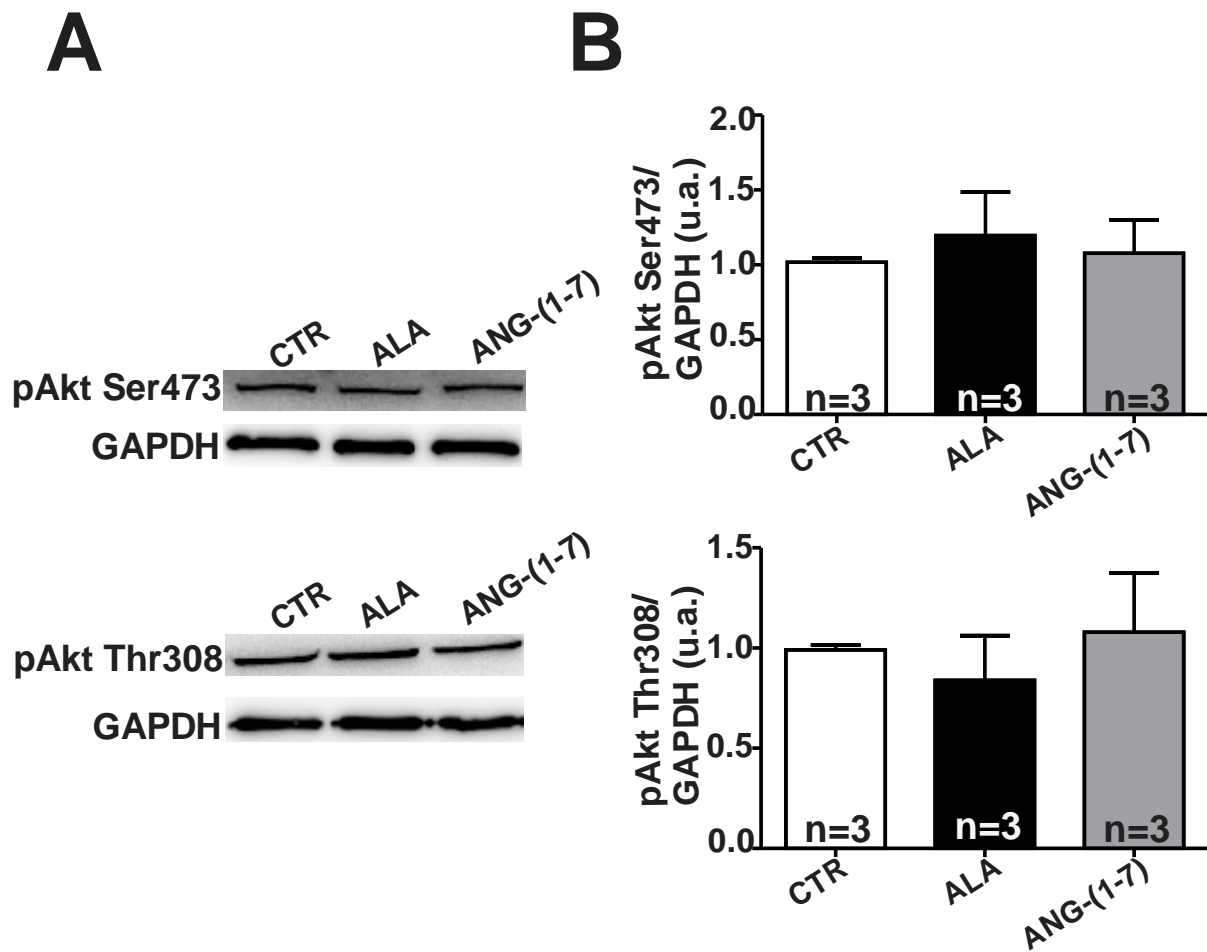


Figura 4: Tratamento agudo com alamandina não induz alteração na fosforilação na Akt. A) Western-blot representativos da fosforilação da proteína Akt nos sítios Ser473 ou Thr308 em cardiomiócitos adultos tratados com alamandina ou angiotensina-(1-7) durante 5 minutos. B) Gráfico de barras com a média densitométrica referente a Akt fosforilada nos resíduos Ser473 e Thr308. O GAPDH foi utilizado como normalizador. CTR = Controle, ALA = Alamandina e ANG-(1-7) = Angiotensina-(1-7). n = número de experimentos independentes.

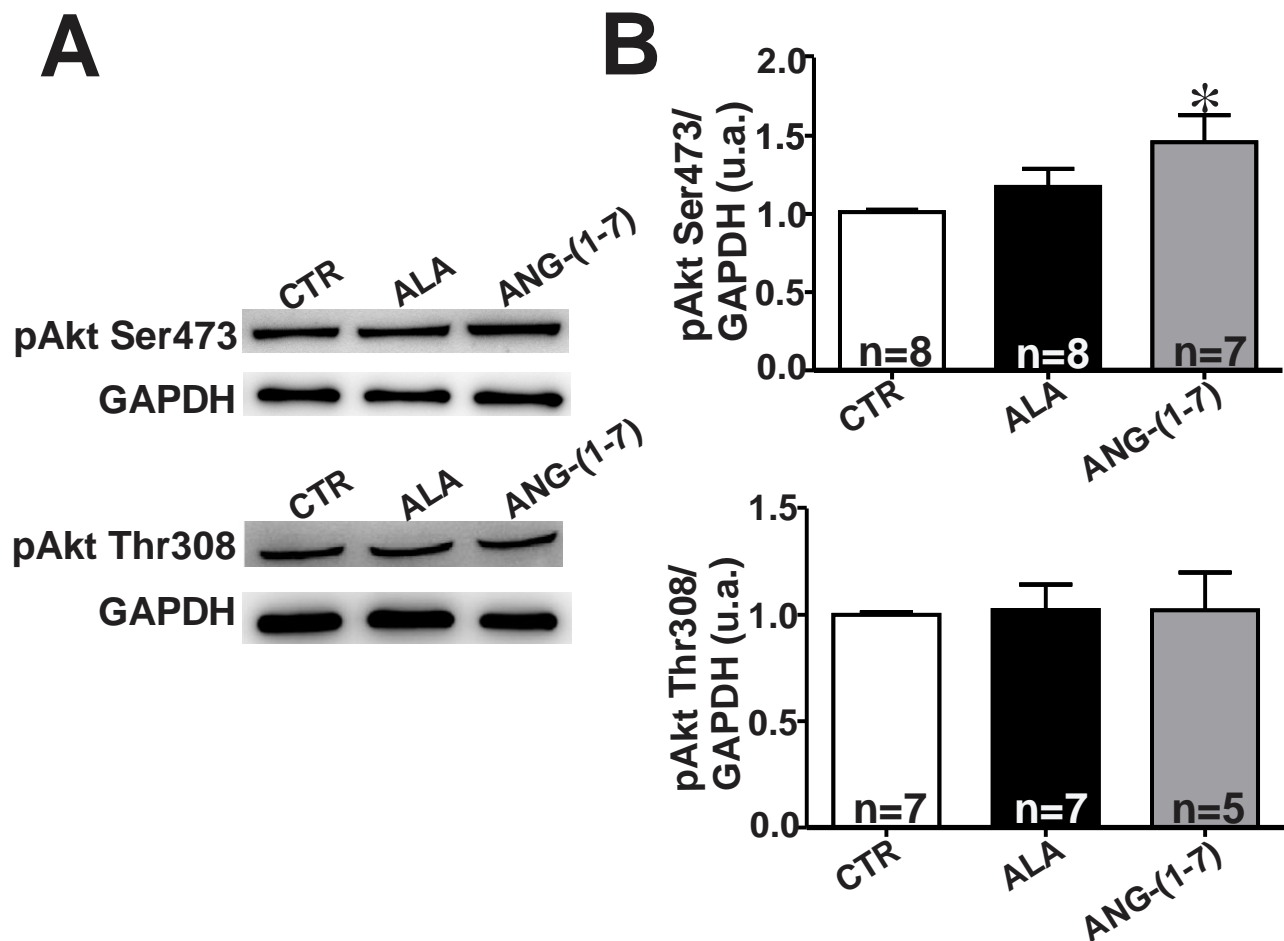


Figura 5: Tratamento agudo com alamandina não induz alteração na fosforilação na Akt. A) Western-blots representativos da fosforilação da proteína Akt nos sítios Ser473 ou pAkt (Thr308) em cardiomiócitos adultos tratados com alamandina ou angiotensina-(1-7) durante 15 minutos. B) Gráfico de barras com a média densitométrica referente a Akt fosforilada nos resíduos Ser473 ou Thr308. O GAPDH foi utilizado como normalizador. CTR = Controle, ALA = Alamandina e ANG-(1-7) = Angiotensina-(1-7). n = número de experimentos independentes.

5.3. Alamandina induz aumento na fosforilação da AMPK α em cardiomiócitos ventriculares

A AMPK α (proteína quinase ativada por AMP) é uma enzima conhecida por ser uma das grandes reguladoras do metabolismo (Lipovka e Konhilas, 2015). Além disto, seu papel na regulação da produção de óxido nítrico no coração já foi descrita (Li et al., 2004). Tendo em vista que a alamandina aumentou a produção de NO em cardiomiócitos, decidimos avaliar o nível de fosforilação desta proteína no seu sítio

ativador em resposta a alamandina. Como visto na figura 6, cardiomiócitos tratados com a alamandina, apresentaram aumento significativo na fosforilação da AMPK α (+53%) após 5 minutos de tratamento, retornando aos níveis basais após 15 minutos.

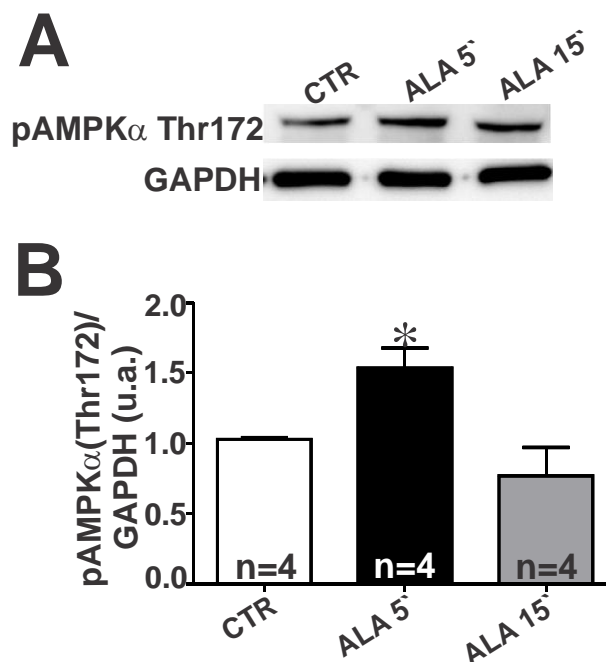


Figura 6: Tratamento agudo com alamandina promove aumento na fosforilação da AMPK α em cardiomiócitos. A) Western-blot representativo mostrando os níveis de fosforilação da pAMPK α (Thr172) em cardiomiócitos adultos. B) Gráfico de barras mostra a média da expressão da AMPK α fosforilada no resíduo Thr172. O GAPDH foi utilizado como normalizador. CTR = Controle, ALA 5' = células tratadas durante 5 minutos, ALA 15' = células tratadas durante 15 minutos. n = número de experimentos independentes. *p<0,05.

5.4. Alamandina aumenta a fosforilação da LKB1 em cardiomiócitos ventriculares

Para confirmar a ativação da via de sinalização da AMPK α , avaliamos o nível de fosforilação da LKB1, uma das quinases responsáveis pela ativação da AMPK α . Como apresentado na figura 7, cardiomiócitos tratados com alamandina, apresentaram aumento na fosforilação da LKB1 no sítio Ser482 (62%, p<0,05) após 5 minutos de tratamento.

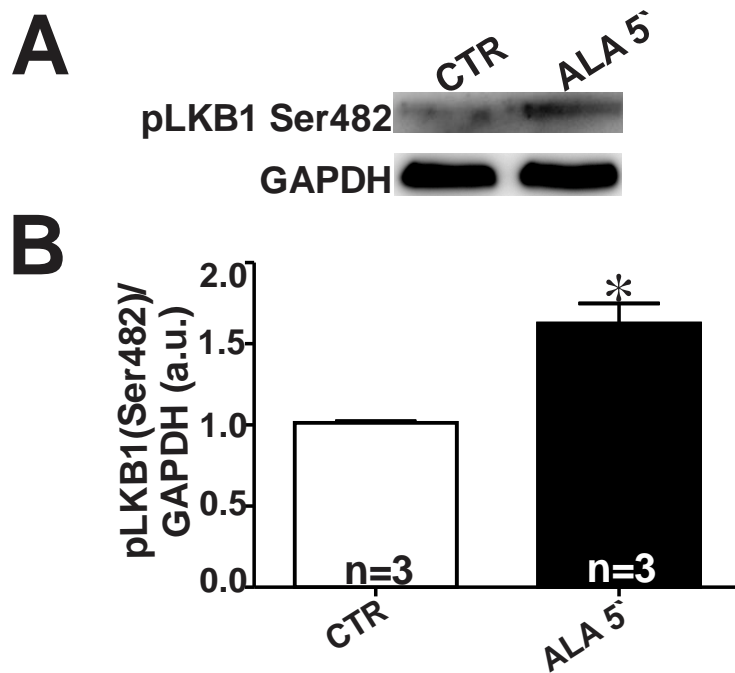


Figura 7: Tratamento de cardiomiócitos com alamandina promove aumento na fosforilação da LKB1. A) Western-blot representativo mostrando os níveis de fosforilação da proteína pLKB1 (Ser428) em cardiomiócitos adultos. B) Gráfico de barras mostra a média da análise densitométrica dos níveis de fosforilação da LKB1 no resíduo Ser428. O GAPDH foi utilizado como normalizador. CTR = Controle, ALA 5' = células tratadas durante 5 minutos. n = número de experimentos independentes. * $p < 0,05$.

5.5. Alamandina induz aumento na produção de NO em cardiomiócitos via AMPK α

Após observada a ativação da via LKB1/AMPK α pela alamandina, decidimos investigar se a AMPK α estaria envolvida no aumento da produção de NO promovido pela alamandina em cardiomiócitos. Para responder a essa pergunta, pré-incubamos cardiomiócitos com um inibidor da AMPK α , o Composto C (CC), durante 10 minutos na concentração de 10 $\mu\text{mol/L}$. Posteriormente, tratamos as células com a alamandina nas condições citadas acima. Como observado na figura 8, o CC bloqueou em 74% o aumento na produção de NO induzido pela alamandina em cardiomiócitos.

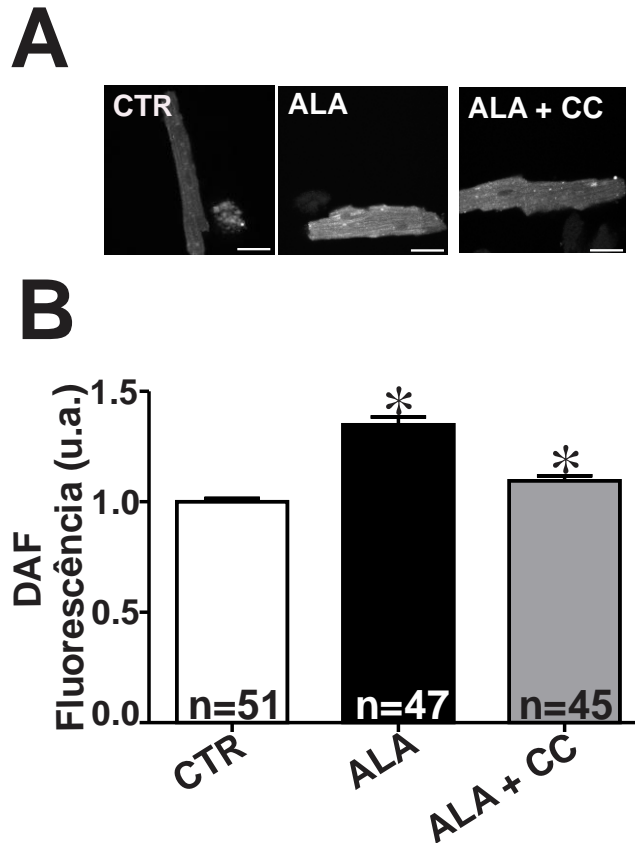


Figura 8: Alamandina promove aumento na produção de NO via AMPK α em cardiomiócitos. A) Imagens representativas de cardiomiócitos adultos marcados com a sonda DAF-FM e tratados com ALA e CC. B) Gráfico de barras da fluorescência do DAF-FM. CTR = Controle, ALA = Alamandina e ALA + CC = Alamandina + Composto C. n = número de cardiomiócitos analisados em 3 experimentos independentes. * $p < 0,05$.

5.6. Alamandina ativa a via LKB1/AMPK α /NO em cardiomiócitos ventriculares independentemente do receptor MAS

O próximo passo deste trabalho foi investigar qual receptor estaria envolvido na ativação da via AMPK α /NO em cardiomiócitos. Para estudar a participação do receptor MAS no efeito da alamandina sobre esta via, cardiomiócitos ventriculares provenientes de camundongos que apresentam deleção genética do receptor MAS (MAS-KO) foram tratados com alamandina durante 5 e 15 minutos. A figura 9 mostra que o efeito da alamandina sob a LKB1 e AMPK α está preservado em cardiomiócitos nocautes para o MAS.

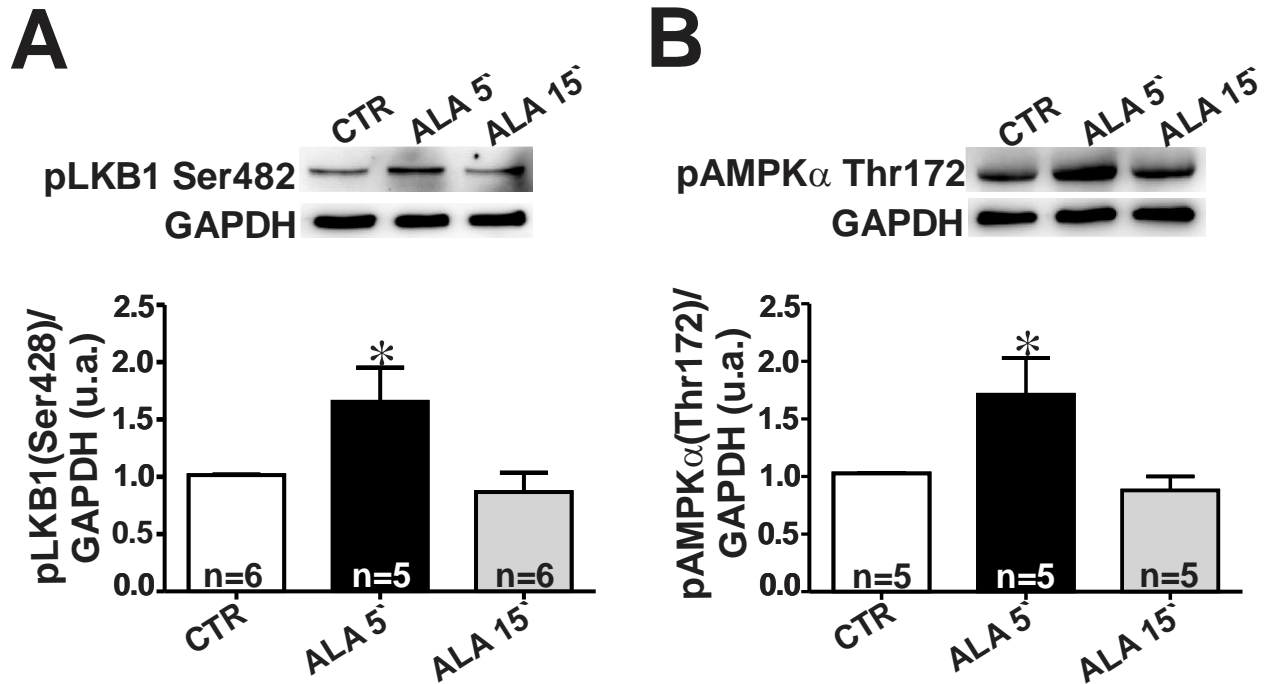


Figura 9: O efeito da alamandina na fosforilação da LKB1 e da AMPK α está preservado em cardiomiócitos provenientes de camundongos MAS-KO. A) Western-blot representativo mostrando os níveis de fosforilação da proteína pLKB1 (Ser482) e gráfico de barras com a média da LKB1 fosforilada no resíduo Ser482. B) Western-blot representativo mostrando os níveis de fosforilação da proteína pAMPK α (Thr172) e gráfico de barras com a média da AMPK α fosforilada no resíduo Thr172. O GAPDH foi utilizado como normalizador. CTR = Controle, ALA 5' = células tratadas durante 5 minutos, ALA 15' = células tratadas durante 15 minutos. n = número de experimentos independentes. *p<0,05.

Também observamos que os cardiomiócitos provenientes de camundongos MAS-KO, quando tratados com alamandina, apresentam aumento na produção de NO (figura 10).

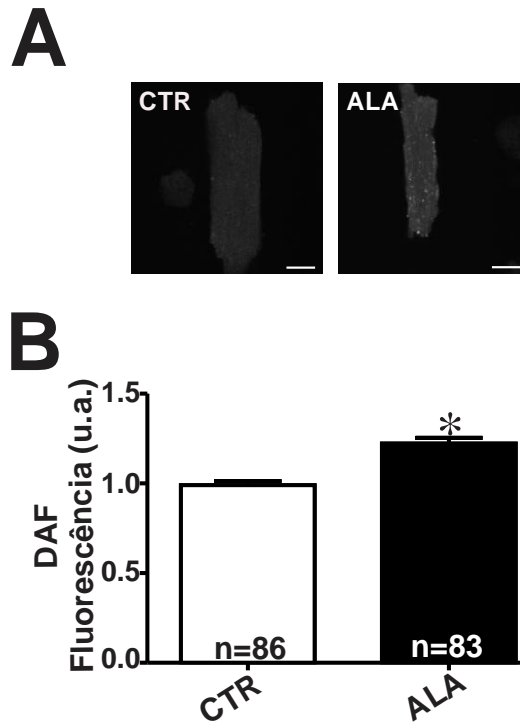


Figura 10: Alamandina induz aumento na produção de NO independentemente do receptor MAS.

A) Imagens representativas de cardiomiócitos adultos isolados do animal MAS-KO marcados com a sonda DAF-FM e tratados com ALA. B) Gráfico de barras da fluorescência do DAF-FM. CTR = Controle, ALA = Alamandina. n = número de cardiomiócitos analisados em 4 experimentos independentes. * $p < 0,05$.

5.7. Alamandina ativa a AMPK α via receptor MrgD em cardiomiócitos ventriculares

Uma vez excluída a participação do receptor MAS na ativação da AMPK α pela alamandina, realizamos este mesmo experimento em cardiomiócitos isolados de animais com deleção gênica do MrgD, o MrgD-KO. Ao contrário do observado nas células dos animais selvagens, a alamandina não promoveu aumento na fosforilação da AMPK α nos cardiomiócitos nocautes para o MrgD (figura 11).

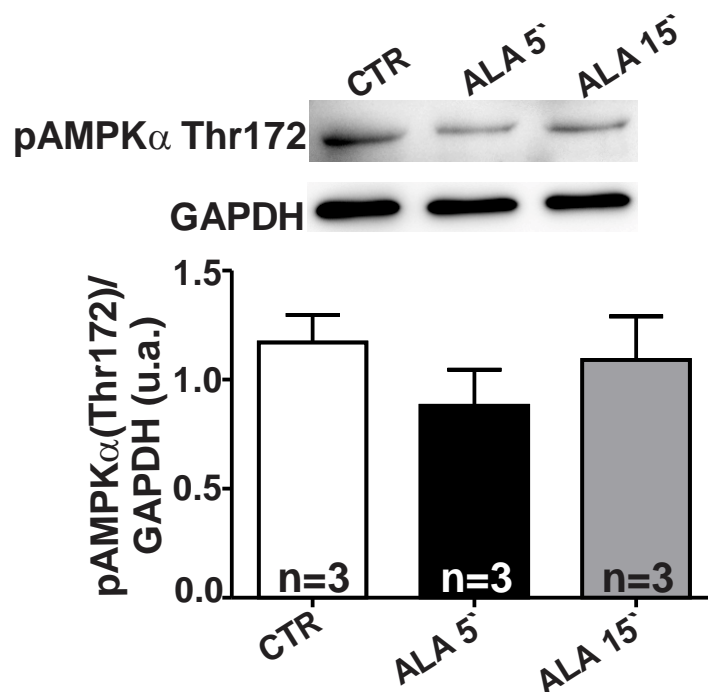


Figura 11: Efeito da alamandina na fosforilação da AMPK α é perdido em cardiomiócitos provenientes de camundongos MrgD-KO. A) Gráfico de barras com a média da fosforilação da AMPK α no resíduo Thr172. A AMPK α foi utilizada como normalizador. CTR = Controle, ALA 5' = células tratadas durante 5 minutos, ALA 15' = células tratadas durante 15 minutos. n = número de experimentos independentes.

5.8. Alamandina aumenta a produção de NO via MrgD

Tendo em vista que o receptor MrgD está envolvido na ativação da AMPK α pela alamandina, decidimos investigar se o MrgD medeia o aumento da produção de NO induzido pela alamandina. Para isto, pré-tratamos cardiomiócitos de animais selvagens com o antagonista do receptor MrgD, o D-Pro⁷-Ang-(1-7) (D-Pro⁷) durante 10 minutos na concentração de 1 μ mol/L. Após este período, as células foram tratadas com alamandina nas condições supracitadas. A figura 12 mostra que o D-PRO⁷ aboliu o efeito da alamandina sob a produção do NO.

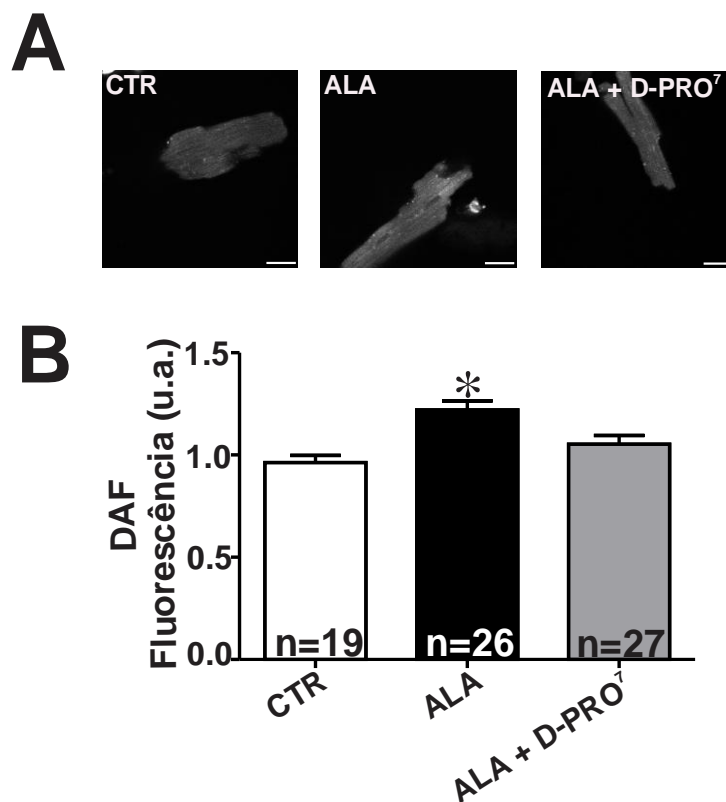


Figura 12: Alamandina induz aumento na produção de NO via MrgD em cardiomiócitos. A) Imagens representativas de cardiomiócitos adultos marcados com a sonda DAF-FM e tratados com ALA e D-Pro⁷. B) Gráfico de barras referente a fluorescência do DAF-FM. CTR = Controle, ALA = Alamandina e ALA + D-Pro⁷ = Alamandina + D-Pro⁷-Ang-(1-7). n = número de cardiomiócitos analisados em 2 experimentos independentes. *p<0,05.

Para confirmar o resultado acima, isolamos cardiomiócitos do animal MrgD-KO, e tratamos as células com a alamandina. Nas células dos animais MrgD-KO a alamandina não promoveu aumento na produção de NO (figura 13).

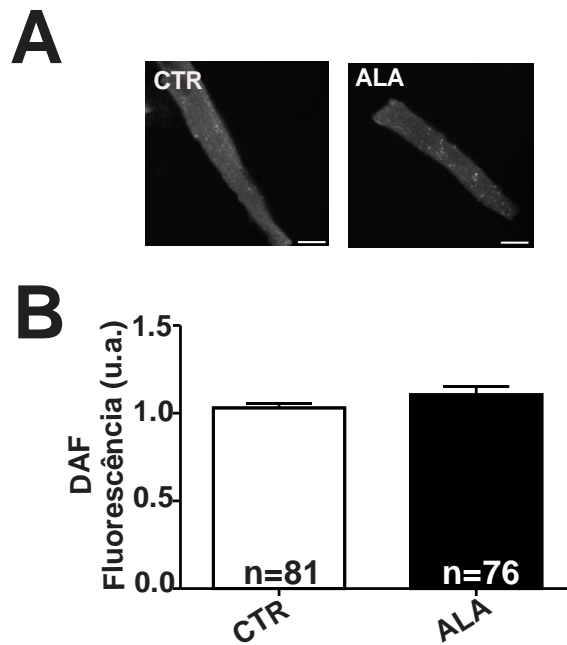


Figura 13: O efeito da alamandina sob a produção de NO é perdido em cardiomiócitos do animal MrgD-KO. A) Imagens representativas de cardiomiócitos adultos isolados do animal MrgD-KO marcados com a sonda DAF-FM e tratados com ALA. B) Gráfico de barras da fluorescência do DAF-FM. CTR = Controle, ALA = Alamandina. n = número de cardiomiócitos analisados em 4 experimentos independentes.

5.9. Alamandina ativa a AMPK α em cardiomiócitos ventriculares de animais hipertensos.

O próximo passo deste trabalho foi avaliar se a alamandina seria capaz de ativar a AMPK α em cardiomiócitos de animais com disfunção cardíaca causada por hipertensão. O modelo utilizado foi o rato TGR (mREN2) 27, que apresenta o gene murino da renina inserido em seu genoma, e por isso superexpressa a renina e consequentemente apresenta aumento de angiotensina II. Entre as disfunções cardiovasculares que este animal apresenta destacam-se: hipertensão arterial, hipertrofia ventricular severa e perda da função cardíaca (Morri et al., 2007).

Primeiramente, avaliamos o nível da fosforilação da AMPK α em cardiomiócitos ventriculares de ratos controle, o Spreague-Dawley (SD). Como observado na figura 14A, a alamandina aumentou a fosforilação da AMPK α em cardiomiócitos SD após 15 minutos de tratamento. Também observamos ativação da LKB1, após 15 minutos de tratamento, nos cardiomiócitos deste animal (figura 14B). Nos cardiomiócitos isolados

do animal TGR (mREN2) 27, a alamandina promoveu aumento na fosforilação da AMPK α no tempo de 5 minutos, que persistiu por 15 minutos (figura 14C). O aumento na fosforilação da LKB1 promovido pela alamandina neste modelo foi observado após 5 minutos de tratamento, retornando ao nível basal no tempo de 15 minutos (figura 14D).

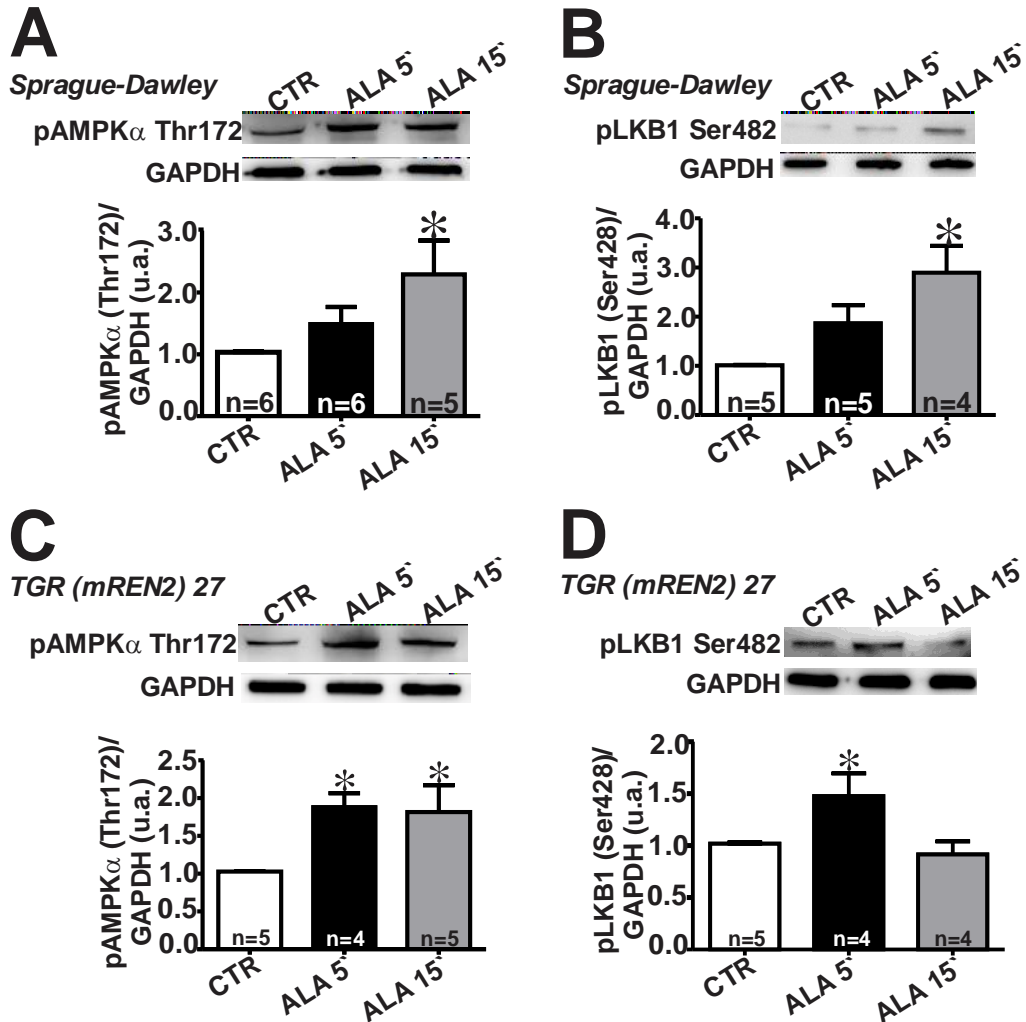


Figura 14: Alamandina ativa a via LKB1/AMPK α em cardiomiócitos de animais com disfunção cardíaca. A e B) Superior - Western-blot representativo mostrando os níveis de fosforilação das proteínas AMPK α (Thr172) e pLKB1 (Ser428) em cardiomiócitos de ratos SD. Inferior - Gráficos de

barras com a média da expressão da AMPK α Thr172 e LKB1 Ser482. B) Superior - Western-blot representativo mostrando os níveis de fosforilação das proteínas AMPK α (Thr172) e pLKB1 (Ser482) em cardiomiócitos de ratos TGR (mREN2) 27. Inferior - Gráficos de barras com a média da expressão da AMPK α Thr172 e LKB1 Ser482. O GAPDH foi utilizado como normalizador. CTR = Controle, ALA 5' = células tratadas durante 5 minutos, ALA 15' = células tratadas durante 15 minutos. n = número de experimentos independentes. *p<0,05.

PARTE II: ALAMANDINA PROMOVE EFEITO ANTI-HIPERTRÓFICO EM CULTURA DE CARDIOMIÓCITOS NEONATOS TRATADOS COM ANG II

A segunda parte deste trabalho foi realizada em cultura de cardiomiócitos provenientes de ratos Wistar neonatos (1-3 dias de vida). Utilizamos este modelo para investigar se a alamandina seria capaz de prevenir os efeitos hipertróficos da Ang II e quais vias estariam envolvidas neste efeito.

5.10. Alamandina previne a hipertrofia celular induzida pela Ang II

O próximo passo foi avaliar se a alamandina seria capaz de prevenir o aumento da área celular ou hipertrofia celular, induzida pela angiotensina II. Para isto, cardiomiócitos neonatais foram tratados durante 36 horas com angiotensina II (100 nmol/L), alamandina (100 nmol/L) ou concomitantemente com os dois peptídeos. Após este período as células foram utilizadas para imunofluorescência e para experimentos de PCR em tempo real. Na figura 15A estão representadas as células dos quatro grupos experimentais. Em vermelho, as células foram marcadas com anticorpo anti- α -actina e em azul o núcleo da célula marcado com DAPI. Após 36 horas de tratamento observamos que a Ang II induziu aumento da área celular (+ 33%, p<0,05) e a alamandina bloqueou este efeito. Não foi observada alteração na área celular no grupo tratado apenas com a alamandina. Para confirmar estes achados, avaliamos dois genes que são regulados pela Ang II, a cadeia pesada de miosina (MHY7) e o canal de cálcio tipo L. Observamos que o aumento na expressão do RNA mensageiro induzido pela Ang II destes dois alvos foi totalmente bloqueado na presença da alamandina (figuras 15C e 15D).

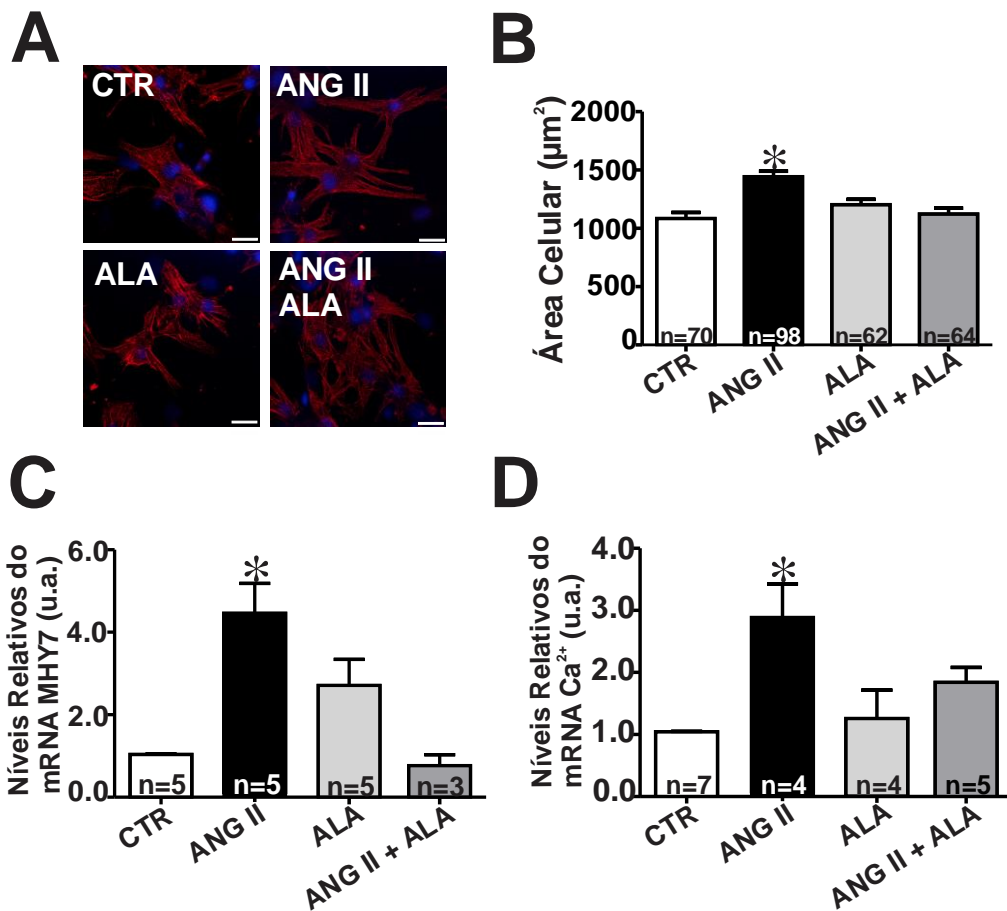


Figura 15: Alamandina bloqueia o efeito da angiotensina II em cardiomiócitos neonatos. A) Imagens representativas de cardiomiócitos marcados com α -actinina (vermelho) e DAPI (azul). B) Gráfico em barras da análise da área celular. C) Gráfico em barras da expressão relativa do mRNA da MYH7. D) Gráfico em barras da expressão relativa do Ca^{2+} . CTR = controle, ANG II = angiotensina II, ALA = alamandina e ANG II + ALA = angiotensina II + alamandina. n = número de células analisadas de 5 experimentos independentes. * $p < 0,05$.

Para avaliar se a alamandina é capaz de ativar AMPK na cultura de cardiomiócitos, realizamos uma curva temporal da fosforilação da AMPK α em células tratados durante 12, 24 e 36 horas. Como observado na figura 16, a alamandina promoveu um aumento sustentado da fosforilação da AMPK α no resíduo Thr172.

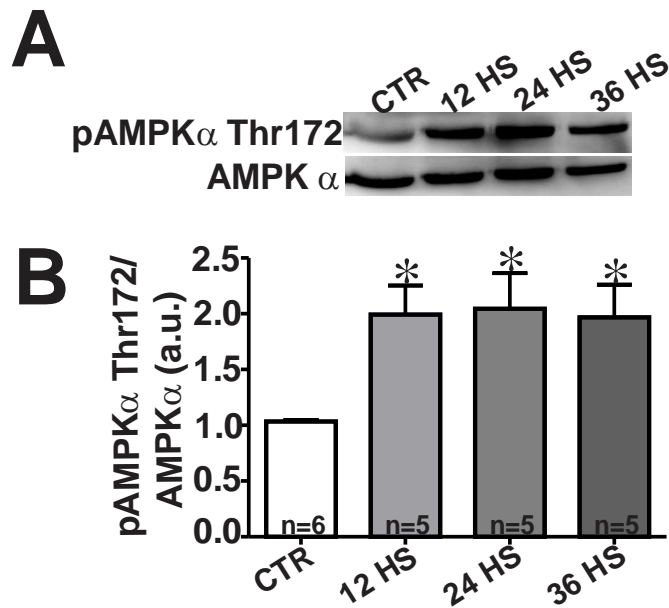


Figura 16: Alamandina promove fosforilação sustentada da AMPK α em cardiomiócitos neonatos.

A) Western-blot representativo mostrando os níveis de fosforilação da AMPK α (Thr172) e AMPK α total em cardiomiócitos neonatos. B) Gráfico de barras mostra a média da expressão da AMPK α fosforilada no resíduo Thr172. A AMPK α foi utilizada como normalizador. CTR = Controle, 12 HS = células tratadas com alamandina durante 12 horas, 24 HS = células tratadas com alamandina durante 24 horas, 36HS = células tratadas com alamandina durante 36 horas. *p<0,05.

Também fizemos uma curva temporal da fosforilação da Akt Ser473 nos cardiomiócitos neonatos tratados durante 12, 24 e 36 horas. Nestas condições, observamos uma ativação transitória da Akt no ponto 24 horas (figura 17).

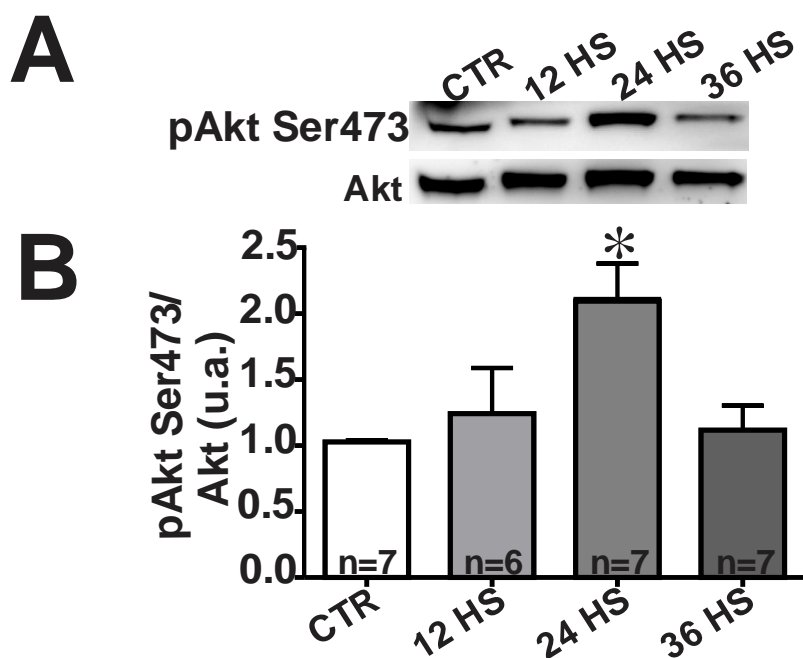


Figura 17: Alamandina promove fosforilação transitória da Akt em cardiomiócitos neonatos. A) Gel representativo da expressão das proteínas pAkt (Ser473) e Akt em cardiomiócitos neonatos. B) Gráfico de barras mostra a média dos níveis de fosforilação da Akt fosforilada no resíduo Ser473. A Akt foi utilizada como normalizador. CTR = Controle, 12 HS = células tratadas com alamandina durante 12 horas, 24 HS = células tratadas com alamandina durante 24 horas, 36HS = células tratadas com alamandina durante 36 horas. * $p < 0,05$.

A seguir, investigamos quais vias estariam envolvidas no efeito anti-hipertrófico da alamandina frente à angiotensina II. Para isso, tratamos cardiomiócitos durante 36 horas com angiotensina II e alamandina nas concentrações citadas acima, em conjunto com um serie de antagonistas e inibidores. Para estudar a participação do receptor MAS no efeito anti-hipertrófico da alamandina, tratamos as células com o antagonista do receptor MAS, o A-779 ($1\mu\text{mol/l}$), na presença da alamandina e da angiotensina II. Como observado na figura 18, o A-779 não bloqueou o efeito anti-hipertrófico da alamandina.

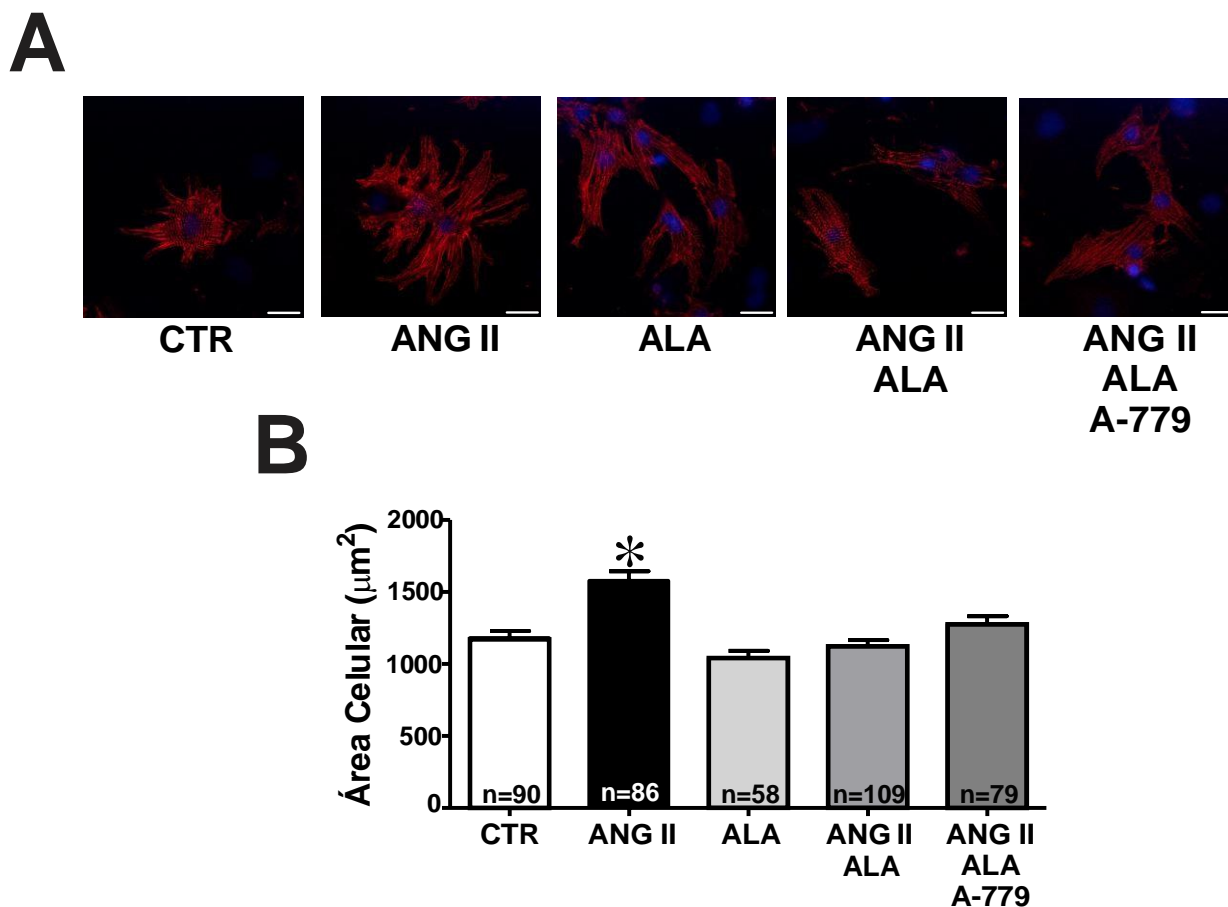


Figura 18: Efeito anti-hipertrófico da alamandina independe do receptor MAS. A) Imagens representativas de cardiomiócitos neonatos marcados com α -actinina (vermelho) e DAPI (azul) obtidas no microscópio confocal. B) Gráfico de barras mostra a média da área celular dos cinco grupos experimentais. CTR = Controle, ANG II = angiotensina II, ALA = alamandina, ANG II + ALA = angiotensina II + alamandina e ANG II + ALA + A-779 = angiotensina II + alamandina + A-779. * $p < 0,05$ quando comparado aos outros grupos experimentais. n = número de células analisadas em 3 experimentos independentes.

Uma vez excluída a participação do receptor MAS no efeito anti-hipertrófico da alamandina, tratamos os cardiomiócitos neonatos com o D-Pro⁷ (1 $\mu\text{mol/L}$). O D-Pro⁷ bloqueou totalmente o efeito anti-hipertrófico da alamandina, confirmando o envolvimento do MrgD nas ações da alamandina (figura 19).

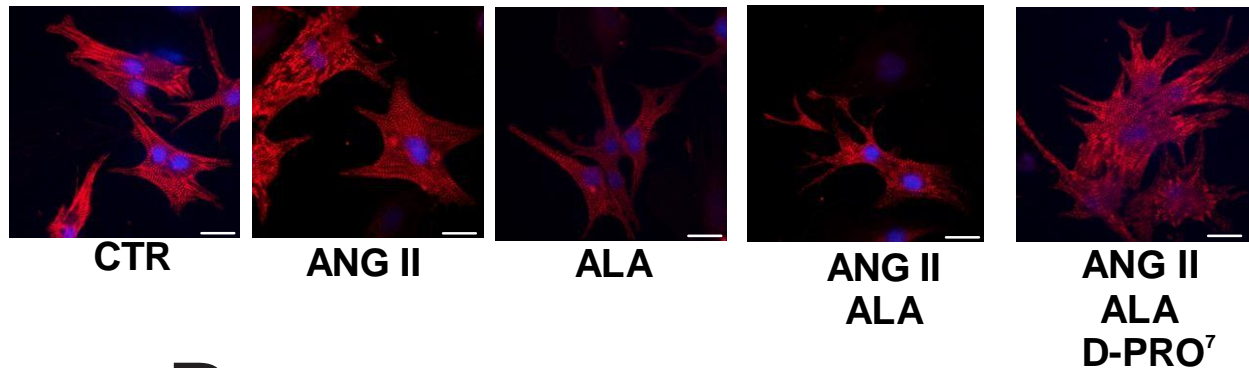
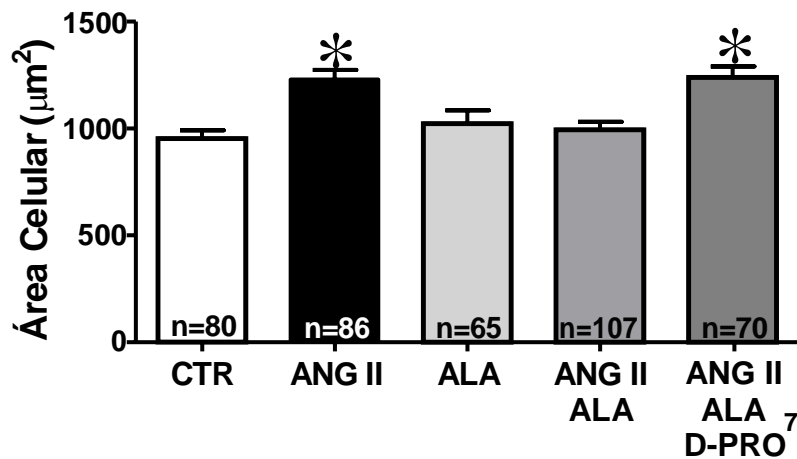
A**B**

Figura 19: Alamandina promove efeito anti-hipertrofico via receptor MrgD em cardiomiócitos neonatos. A) Imagens representativas de cardiomiócitos neonatos marcados com α -actinina (vermelho) e DAPI (azul) obtidas no microscópio confocal. B) Gráfico de barras mostra a média da área celular dos cinco grupos experimentais. CTR = Controle, ANG II = angiotensina II, ALA = alamandina, ANG II + ALA = angiotensina II + alamandina e ANG II + ALA + D-Pro⁷ = angiotensina II + alamandina + D-Pro⁷. * $p < 0,05$ quando comparados aos grupos controle, alamandina e Ang II + alamandina. n = número de células analisadas em 4 experimentos independentes.

Em seguida, usamos um inibidor das óxido nítrico sintases (L-NAME, 10µmol/L) para estudar se o efeito anti-hipertrofico da alamandina envolvia a produção de NO. De fato, como visto na figura 20, o L-NAME inibiu o efeito anti-hipertrofico da alamandina nas células tratadas com angiotensina II.

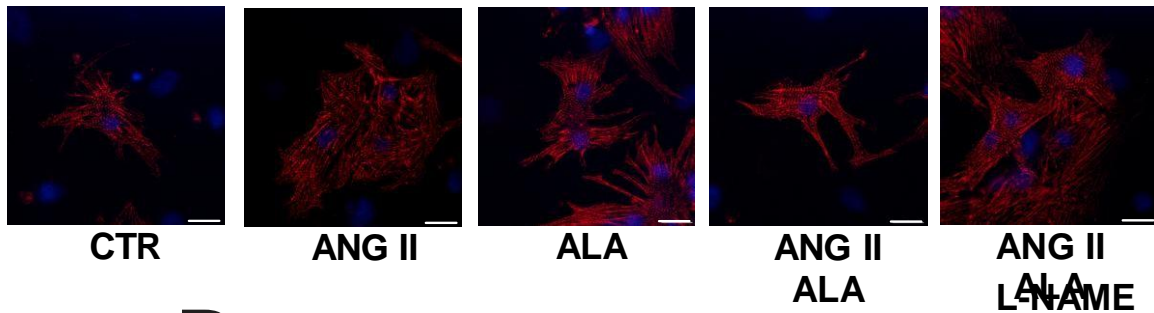
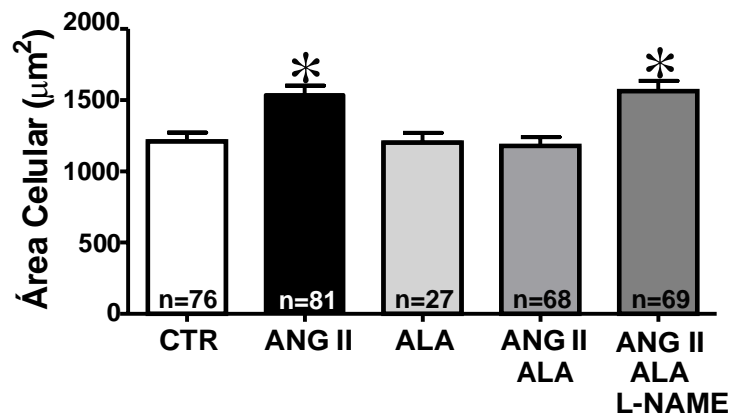
A**B**

Figura 20: O NO está envolvido no efeito anti-hipertrófico da alamandina em cardiomiócitos neonatos. A) Imagens representativas de cardiomiócitos neonatos marcados com α -actina (vermelho) e DAPI (azul) obtidas no microscópio confocal. B) Gráfico de barras mostra a média da área celular dos seis grupos experimentais. CTR = Controle, ANG II = angiotensina II, ALA = alamandina, ANG II + ALA = angiotensina II + alamandina e ANG II + ALA + L-NAME = angiotensina II + alamandina + L-NAME. * $p < 0,05$ quando comparado aos grupos controle, alamandina e Ang II + alamandina. n = número de células analisadas em 4 experimentos independentes.

E, por fim, inibimos a AMPK α com o objetivo de verificar se essa quinase também estaria atuando no efeito anti-hipertrófico da alamandina. Interessantemente, observamos que o CC preveniu a ação anti-hipertrófica da alamandina em células expostas a Ang II (figura 21).

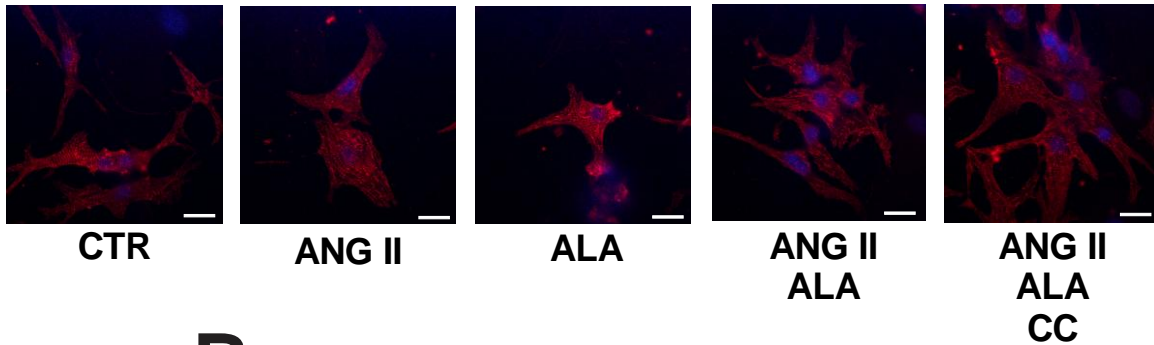
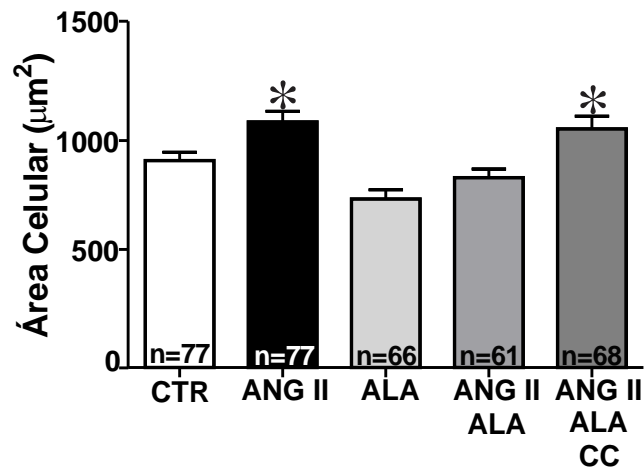
A**B**

Figura 21: A AMPK α participa do efeito anti-hipertrófico da alamandina em cardiomiócitos neonatos. A) Imagens representativas de cardiomiócitos neonatos marcados com α -actinina (vermelho) e DAPI (azul) obtidas no microscópio confocal. B) Gráfico de barras mostra a média da área celular dos cinco grupos experimentais. CTR = Controle, ANG II = angiotensina II, ALA = alamandina, ANG II + ALA = angiotensina II + alamandina e ANG II + ALA + CC = angiotensina II + alamandina + composto C. * $p < 0,05$ quando comparados aos grupos controle, alamandina e Ang II + alamandina. n = número de células analisadas em 3 experimentos independentes.

6. DISCUSSÃO

Os principais achados deste trabalho foram: i) alamandina promove aumento na produção de NO e ativação da via LKB1/AMPK α via receptor MrgD; ii) alamandina aumenta a produção de NO em cardiomiócitos via AMPK α ; iii) ativação da via LKB1/AMPK α em resposta a alamandina é observada em cardiomiócitos provenientes de animais hipertensos e iv) a alamandina previne a hipertrofia celular induzida pela angiotensina II.

O óxido nítrico tem sido descrito como um importante modulador da função cardíaca em condições fisiológicas e patológicas. O NO é produzido por três óxido nítrico sintases (eNOS, iNOS e nNOS), expressas em várias células, inclusive cardiomiócitos (Seddon et. al., 2007; Feron et. al., 1996). No cardiomiócito o NO atua modulando vários processos fisiológicos como o manejo do cálcio, a sensibilidade dos miofilamentos ao cálcio, além de atuar como sinalizador em diferentes vias celulares envolvidas na sobrevivência e hipertrofia do cardiomiócito (Xu et. al., 1999; Seddon et. al., 2007; Loyer et. al., 2008; Scherrer-Crosbie et. al., 2001). Neste trabalho, observamos que assim como a angiotensina-(1-7), a alamandina promoveu o aumento na produção de NO em cardiomiócitos. Lautner et al., demonstraram que em aorta de camundongos o vasorelaxamento promovido pela alamandina era abolido na presença do L-NAME. Além disto, Habiyakare et al. observaram que o MrgD colocaliza com a eNOS em aorta de coelhos. Desta forma, nossos dados corroboram e expandem achados prévios que apontam o NO como importante sinalizador intracelular da alamandina no sistema cardiovascular.

Anteriormente, já foi demonstrado que a Ang-(1-7) por meio do receptor MAS promove a maioria das suas ações intracelulares através da ativação da via PI3K/Akt/eNOS. Em cardiomiócitos, Dias Peixoto et al., 2008, descreveram a participação desta via nos efeitos da Ang-(1-7) e na produção de NO. Ainda no mesmo estudo, os autores observaram aumento da fosforilação da Akt no sítio Ser473 e da eNOS no sítio Ser1177 em cardiomiócitos tratados com Ang-(1-7). Este resultado ampliou os achados de Sampaio et al., 2007, que descreveram a participação tanto da eNOS quanto da Akt nos efeitos da Ang-(1-7) em células endoteliais. Em ambos os

estudos (Dias Peixoto et al., 2008 e Sampaio et al., 2007), a ação da Ang-(1-7) sobre a produção de NO foi totalmente abolida na presença do A-779, ou em células provenientes de camundongos MAS-KO, confirmando a participação do receptor MAS nos efeitos da Ag-(1-7).

Em células submetidas ao tratamento com Ang-(1-7) confirmamos que esse peptídeo promoveu a fosforilação da Akt no resíduo de Ser473. De forma interessante, o mesmo efeito não foi observado em resposta ao tratamento de 5 e 15 minutos com alamandina em cardiomiócitos. Logo, este resultado sugere que alamandina e Ang-(1-7), aparentemente, utilizam vias distintas para a produção de NO na célula cardíaca. Além da Akt, a AMPK α é uma outra quinase que quando ativada, leva a produção de NO via eNOS, como descrito por Li et al., 2004; Reihill et al., 2007; Chen et al., 1999. De fato, observamos aumento na fosforilação da AMPK α no resíduo Thr172 em cardiomiócitos adultos tratados com a alamandina. Ademais, utilizando um inibidor da AMPK α , comprovamos de uma segunda forma, que a alamandina aumenta a produção de NO em cardiomiócitos adultos por meio da ativação desta quinase.

A fosforilação da AMPK α no sítio Thr172 reflete seu estado de ativação e é influenciada por diferentes quinases e fosfatases. As duas principais quinases responsáveis por fosforilar e ativar a AMPK α são a CAMKK β e a LKB1 (Hawley et al., 2005; Hawley et al., 2003). Confirmando a participação da LKB1 neste processo, também observamos seu aumento de fosforilação, em cardiomiócitos após 5 minutos de tratamento com alamandina. Já a atividade da CAMKK β , para sua ativação é necessária a alteração intracelular de cálcio e como dados prévios obtidos pelo nosso grupo de pesquisa indicam que a alamandina não induz alteração no transiente de cálcio em cardiomiócitos (dados não publicados), achamos improvável que nas nossas condições experimentais a CAMKK β estaria ativada.

A similaridade estrutural compartilhada pela Ang-(1-7) e alamandina, nos levou a questionar a possibilidade se a alamandina não estaria exercendo seus efeitos, em parte, por meio do receptor MAS. No entanto, experimentos realizados com cardiomiócitos isolados do animal nocaute para o receptor MAS, descartaram esta possibilidade, uma vez que observamos aumento da fosforilação da LKB1, AMPK α e

da produção de NO, nestas células em resposta a alamandina. Resultado similar foi observado por Lautner et al, em aorta de camundongos MAS-KO em resposta a alamandina. Mais especificamente, os autores observaram que o vasorelaxamento promovido pela alamandina estava presente nesses vasos. Além disto, o antagonista do receptor MAS, o A-779, não foi capaz de bloquear o efeito da alamandina no relaxamento de aorta em animais selvagens. Em conjunto, ambos os dados apresentam forte evidência de que o receptor MAS não participa dos efeitos da alamandina, nas concentrações utilizadas nos dois estudos.

Evoluindo no mecanismo de ação da alamandina, submetemos cardiomiócitos provenientes de camundongos MrgD-KO ao tratamento com alamandina. Nestas células observamos que a alamandina não foi capaz de aumentar a fosforilação da AMPK α , confirmando a participação do receptor MrgD nos efeitos da alamandina em cardiomiócitos. Além disto, o aumento na produção de NO promovido pela alamandina, em cardiomiócitos, foi bloqueado tanto na presença do antagonista do MrgD, o D-PRO⁷, quanto em cardiomiócitos de camundongos MrgD-KO. Lautner et al., também obtiveram um resultado semelhante, em aortas de camundongos selvagens pré-incubadas com o D-PRO⁷, não foi observado vasorelaxamento em resposta a alamandina. Interessante, quando as aortas foram pré-incubadas com o agonista endógeno do MrgD, a β -alanina, o vasorelaxamento promovido pela alamandina também foi inibido. E, por fim, os mesmos autores observaram aumento na produção de NO em células CHO transfectadas com o receptor MrgD e estimuladas com alamandina, comprovando desta forma a participação deste receptor nos efeitos biológicos da alamandina.

A AMPK α é uma treonina/serina quinase que dentre outros efeitos, está envolvida na fosforilação da eNOS e na regulação da homeostase energética celular. Em cardiomiócitos já foi descrito que a AMPK α é responsável por aumentar a β -oxidação, controlar o transporte de ácidos graxos através da membrana plasmática de miócitos cardíacos, estimular a biogênese mitocondrial e aumentar a captação de glicose via GLUT4 e GLUT1 (Lipovka e Konhilas, 2015). A ativação da AMPK α pela alamandina observada em cardiomiócitos de animais hipertensos, sugere um papel

terapêutico deste peptídeo, em condições de doença cardíaca. É interessante salientar que observamos a manutenção do efeito da alamandina na fosforilação da AMPK α , mesmo após 15 minutos de tratamento nas células de animais mRen. Este fato, por sua vez, não foi observado nas células dos animais controle, C57BL/6 e SD. Especulamos que isto pode ter acontecido por alguns motivos, como: (i) a fosforilação basal da AMPK α no cardiomiócito do mREN é mais baixa quando comparada a fosforilação do animal controle e por isso as células do animal doente são mais susceptíveis a um estímulo pró-fosforilação e a manutenção deste sinal; (ii) cardiomiócitos provenientes de ratos mRen podem apresentar alteração na expressão de fosfatases responsáveis por desfosforilar a AMPK α ; e (iii) a expressão do receptor MrgD pode estar alterada em cardiomiócitos do animal mREN.

Ainda nas células do animal mREN, a alamandina promoveu uma rápida ativação da LKB1 e após 15 minutos de tratamento a fosforilação desta proteína retornou ao seu nível basal. Porém, neste mesmo tempo de tratamento (15 minutos) ainda observamos fosforilação da AMPK α , um componente *downstream* da via. Tendo em vista este resultado, não podemos descartar a possibilidade da CAMKK β estar envolvida na cascata de sinalização desencadeada pela alamandina em cardiomiócitos do animal mREN.

Com o intuito de explorar o potencial cardioprotetor da alamandina, submetemos cardiomiócitos neonatos tratados com Ang II por 36 horas ao tratamento concomitante com alamandina. Neste modelo observamos que alamandina preveniu o aumento da área celular em resposta a Ang II. Também observamos que a Ang II promoveu aumento na expressão do mRNA que codifica para MYH7 e para o canal de cálcio tipo L. O aumento destes dois alvos da Ang II foi bloqueado na presença da alamandina. Vale ressaltar, que a concentração de alamandina utilizada neste trabalho não alterou a área celular dos cardiomiócitos e nem a expressão destes mRNAs. Em conjunto, estes dados apontam uma importante ação anti-hipertrófica exercida pela alamandina.

Quando avaliamos por meio do western blot o nível de fosforilação da AMPK α e da Akt nos cardiomiócitos neonatos, observamos que alamandina promoveu um aumento sustentado na ativação da AMPK α , observado nos tempos de 12, 24 e 36

horas, enquanto foi observado um aumento transitório na fosforilação da Akt, observado 24 horas após estimulação. Estes dados nos levam a crer que estas duas quinases exercem um papel importante na cascata de sinalização protetora da alamandina. Embora não foi observada alteração da Akt em resposta a alamandina em células provenientes de camundongos adultos, este dado sugere que: i) a Akt seja ativada pela alamandina apenas em condições de tratamento prolongado; ii) que os tempos de tratamento ou concentração de alamandina utilizados no nosso estudo não foi adequada para observamos um efeito da alamandina na ativação da Akt ou iii) que devido as diferenças existentes entre cardiomiócitos provenientes de neonatos ou adultos a alamandina ative vias de sinalização distintas.

Levando em consideração os resultados obtidos nos miócitos cardíacos adultos, resolvemos investigar qual o receptor poderia estar envolvido no efeito anti-hipertrófico da alamandina. Corroborando os achados obtidos em miócitos adultos, mostramos que o receptor MAS não participa do efeito anti-hipertrófico da alamandina. Este efeito é mediado via MrgD, uma vez que o D-Pro⁷ bloqueou totalmente a ação protetora da alamandina.

Além disto, quando inibimos a atividade das proteínas envolvidas na produção de óxido nítrico com o L-NAME, observamos que o efeito anti-hipertrófico da alamandina foi bloqueado, evidenciando-se assim o papel do NO nesta via. Os efeitos intracelulares desenvolvidos pelo NO envolvem uma via de sinalização dependente do GMPc: a GMPc-PKG (Fiedler e Wollert, 2004). A PKG é uma quinase que quando ativada é capaz de suprimir a via cálcio-calmodulina-NFAT, reconhecida por estar envolvida no desenvolvimento da hipertrofia cardíaca. Em cardiomiócitos, o aumento do influxo de cálcio provocado por agentes pró-hipertróficos como o isoproterenol e a Ang II, é capaz de ativar a calcineurina, uma fosfatase que promove a desfosforilação do NFAT presente no citoplasma da célula. Quando desfosforilado o NFAT transloca-se para o núcleo da célula, ativando a programação gênica que culminará na hipertrofia cardíaca. Por sua vez, a PKG é capaz de inibir os canais de cálcio do tipo L presentes nos cardiomiócitos. Em última instância, a diminuição do influxo de cálcio causado pelo NO-GMPc/PKG representa um importante efeito inibitório sobre o desenvolvimento da

hipertrofia (Molkentin et al, 1998; Wilkins et al, 2004; Gomes et al, 2010). Logo, apesar de não termos realizado experimentos de imunolocalização do NFAT, é plausível considerar que a alamandina exerce efeito anti-hipertrófico por influenciar na cascata de sinalização calcineurina/NFAT.

Além dos efeitos preponderantes sobre o metabolismo energético do cardiomiócito, a AMPK α também está envolvida na progressão da hipertrofia cardíaca (HC). A HC ocorre como uma consequência do aumento da massa cardíaca e é acompanhada de alterações no metabolismo deste órgão. Alterações na sinalização da AMPK α estão associadas com a transição da hipertrofia para a insuficiência cardíaca (Beauloye et al., 2011). Nossos resultados mostram que AMPK α está envolvida no efeito anti-hipertrófico da alamandina, uma vez que o composto C foi capaz de inibir o efeito da alamandina sobre a hipertrofia celular induzida pela angiotensina II.

Ativadores farmacológicos da AMPK α como o AICA e metformina têm sido descritos como potentes agentes anti-hipertróficos em modelos *in vitro* e *in vivo* (Stuck et al., 2008; Chan et al., 2008; Chan et al., 2004; Hernández et al., 2014). Estes fármacos são capazes de inibir a síntese proteica e a transcrição gênica, envolvidas na hipertrofia cardíaca. Em termos moleculares, já se é bem aceito que AMPK α diminui a síntese proteica, em grande parte, como consequência da inibição da via de sinalização da mTOR (Hornan et al., 2002). Concluímos desta forma que a alamandina exerce efeito anti-hipertrófico por modular uma via importante, que envolve a produção de óxido nítrico e ativação da AMPK α .

7. CONCLUSÃO

Os dados obtidos neste trabalho permitem concluir que a alamandina é capaz de ativar vias protetoras no cardiomiócito, por meio da ativação do receptor MrgD. Dois importantes mediadores moleculares ativados pela alamandina são a AMPK α e o óxido nítrico.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Balakumar P., Gowraganahalli J. (2014). A century old renin–angiotensin system still grows with endless possibilities: AT1 receptor signaling cascades in cardiovascular physiopathology. *Cellular Signalling* (26) 2147–2160.

Beauloye C., Bertrand L., Horman S., Hue L. (2011). AMPK activation, a preventive therapeutic target in the transition from cardiac injury to heart failure. *Cardiovascular Research* (90) 224–233.

Bubikat A., De Windt L. J., Zetsche B., Fabritz L., Sickler H., Eckardt D., Godecke A., Baba H. A., Kuhn M. (2005). Local atrial natriuretic peptide signaling prevents hypertensive cardiac hypertrophy in endothelial nitric-oxide synthase-deficient mice. *Journal of Biological Chemistry* (280) 21594–21599.

Chan A. Y., Dolinsky V. W., Soltys C. L., Viollet B., Baksh S. (2008). Resveratrol inhibits cardiac hypertrophy via AMP-activated protein kinase and Akt. *J Biol Chem.* (283) 24194–24201.

Chan A. Y., Dolinsky V. W., Soltys C. L., Viollet B., Baksh S. Resveratrol inhibits cardiac hypertrophy via AMP-activated protein kinase and Akt. *J Biol Chem.* (283) 24194–24201.

Chan A. Y., Soltys C. L., Young M. E., Proud C. G., Dyck J. R. (2004). Activation of AMP-activated protein kinase inhibits protein synthesis associated with hypertrophy in the cardiac myocyte. *J Biol Chem.* (279) 32771–32779.

Chen Z. P., Mitchelhill K. I., Michell B. J., Stapleton D., Rodriguez-Crespo I., Witters L. A. (1999). AMP-activated protein kinase phosphorylation of endothelial NO synthase. *FEBS Lett* (443) 285–289.

Dias-Peixoto M. F., Santos R. A., Gomes E. R., Alves M. N., Almeida P. W., Greco L., Rosa M., Fauler B., Bader M., Alenina N., Guatimosim S. (2008). Molecular mechanisms involved in the angiotensin-(1-7)/Mas signaling pathway in cardiomyocytes. *Hypertension* 52(3):542-8.

Donoghue M, Hsieh F, Baronas E, Godbout K, Gosselin M, Stagliano N, Donovan M, Woolf B, Robison K, Jeyaseelan R, Breitbart RE, Acton S. (2000). A novel angiotensin-converting enzyme-related carboxypeptidase (ACE2) converts angiotensin I to angiotensin 1-9. *Circulation Research* 1;87(5):E1-9.

Feron O., Belhassen L., Kobzik L., Smith T. W., Kelly R. A., Michel T. (1996). Endothelial nitric oxide synthase targeting to caveolae. Specific interactions with caveolin isoforms in cardiac myocytes and endothelial cells. *J Biol Chem* (271) 22810–4.

Flaherty M. P., Brown M., Grupp I. L., Schultz J. E., Murphree S. S., Jones W. K. (2007). eNOS Deficient Mice Develop Progressive Cardiac Hypertrophy with Altered Cytokine and Calcium Handling Protein Expression. *Cardiovasc Toxicol* (7) 165–177.

Gomes E. R., Lara A. A., Almeida P. W. M., Santos R. A., Guatimosim S. (2010). Angiotensin-(1–7) prevents cardiomyocyte pathological remodeling through a nitric oxide/guanosine 3',5'-cyclic monophosphate-dependent pathway. *Hypertension* 55 (1) 153–160.

Habiyakare B., Alsaadon H., Mathai M. L., Hayes A., Zulli A. (2014). Reduction of angiotensin A and alamandine vasoactivity in the rabbit model of atherogenesis: differential effects of alamandine and Ang(1-7). *International Journal Experimental Pathology* 95, 290–295.

Hawley S. A., Boudeau J., Reid J. L., Mustard K. J., Udd L., Makela T. P., Alessi D. R., Hardie D. G. (2003). Complexes between the LKB1 tumor suppressor, STRAD alpha/beta and MO25 alpha/beta are upstream kinases in the AMP-activated protein kinase cascade. *J Biol.* (2) 28.

Hawley S. A., Pan D. A., Mustard K. J., Ross L., Bain J., Edelman A. M., Frenguelli B. G., Hardie D. G. (2005). Calmodulin-dependent protein kinase kinase is an alternative upstream kinase for AMP-activated protein kinase. *Cell Metab* (2) 9 –19.

Hernandez J. S., Barreto-Torres G., Kuznetsov A. V., Khuchua Z., Javadov S. (2014). Crosstalk between AMPK activation and angiotensin II-induced hypertrophy in cardiomyocytes: the role of mitochondria. *J. Cell. Mol. Med.* (4) 709-720.

Horman S., Browne G., Krause U., Patel J., Vertommen D., Bertrand L., Lavoigne A., Hue L., Proud C., Rider M. (2002). Activation of AMP-activated protein kinase leads to the phosphorylation of elongation factor 2 and na inhibition of protein synthesis. *Curr Biol.* (12) 1419 –1423.

Huang P. L., Huang Z., Mashimo H., Bloch K. D., Moskowitz M. A., Bevan J. A., Fishman M. C. (1995). Hypertension in mice lacking the gene for endothelial nitric oxide synthase. *Nature* (377) 239–242.

Jones E. S., Vinh A., McCarthy C. A., Gaspari T. A., Widdop R. E. (2008). AT2 receptors: Functional relevance in cardiovascular disease. *Pharmacology & Therapeutics* (120) 292–316.

Lautner, R. Q., Villela, D. C., Fraga-Silva, R. a, Silva, N., Verano-Braga, T., Costa-Fraga, F.... Santos, R. A S. (2013). Discovery and characterization of alamandine: a novel component of the renin-angiotensin system. *Circulation Research*, 112(8), 1104–11.

Li J., Hu X., Selvakumar P., Russell R. R., Cushman S. W., Holman G. D. (2004). Role of the nitric oxide pathway in AMPK-mediated glucose uptake and GLUT4 translocation in heart muscle. *Am J Physiol Endocrinol Metab* (287) 834–841.

Lipovka Y., Konhilas J. P. (2015). AMP-Activated Protein Kinase Signalling in Cancer and Cardiac Hypertrophy. *Cardiovasc Pharm Open Access* 4(3).

Lloyd-Jones *et al.* (2010). Heart Disease and Stroke Statistics—2010 Update A Report From the American Heart Association. AHA Statistical Update.

Loyer X., Gomez A. M., Milliez P., Fernandez-Velasco M., Vangheluwe P., Vinet L., Charue D., Vaudin E., Zhang W., Sainte-Marie Y., Robidel E., Marty I., Mayer B., Jaisser F., Mercadier J. J., Richard S., Shah A. M., Benitah J. P., Samuel J. L., Heymes C. (2008). Cardiomyocyte overexpression of neuronal nitric oxide synthase delays transition toward heart failure in response to pressure overload by preserving calcium cycling. *Circulation* (117) 3187–3198.

Mehta P. K., Griendling K. K. (2007). Angiotensin II cell signaling: physiological and pathological effects in the cardiovascular system. *American Journal of Physiology Cell Physiology* 292(1):C82-97.

Molkentin J. D., Lu J. R., Antos C. L., Markham B., Richardson J., Robbins J., Grant S. R., Olson E. N. (1998). A calcineurin-dependent transcriptional pathway for cardiac hypertrophy. *Cell* (93) 215–228.

Mount P. F., Kemp B. E., Power D. A. (2007). Regulation of endothelial and myocardial NO synthesis by multi-site eNOS phosphorylation. *J Mol Cell Cardiol* (42) 271–279.

Nguyen G, Delarue F, Burcklé C, Bouzahir L, Giller T, Sraer J. D. (2002). Pivotal role of the renin/prorenin receptor in angiotensin II production and cellular responses to renin. *Journal of Clinical Investigation* 109(11):1417-27.

Paradis P., Dali-Youcef N., Paradis F.W., Thibault G., Nemer M. (2000). Overexpression of angiotensin II type I receptor in cardiomyocytes induces cardiac hypertrophy and remodeling. *Proc Natl Acad Sci U S A* 18; 97(2): 931–936.

Parekh D. R.: (2011). A review of heart failure in adults with congenital heart disease. *Methodist Debaquey Cardiovascular Journal* (2):26-32.

Reihill J. A., Ewart M. A., Hardie D. G., Salt I. P. (2007). AMP-activated protein kinase mediates VEGF-stimulated endothelial NO production. *Biochem Biophys Res Commun* (354) 1084–1088.

Santos, R. A., Campagnole-Santos, M. J., & Andrade, S. P. (2000). Angiotensin-(1-7): an update. *Regulatory Peptides*, 91(1-3), 45–62.

Scherrer-Crosbie M., Ullrich R., Bloch K. D., Nakajima H., Nasser B., Aretz H. T. (2001). Endothelial nitric oxide synthase limits left ventricular remodeling after myocardial infarction in mice. *Circulation* (104) 1286–1291.

Schlüter K. D., Wenzel S. (2008). Angiotensin II: A hormone involved in and contributing to pro-hypertrophic cardiac networks and target of anti-hypertrophic cross-talks. *Pharmacology & Therapeutics* (119) 311–325.

Seddon M., Shah A. M., Casadei B. (2007). Cardiomyocytes as effectors of nitric oxide signalling. *Cardiovascular Research* (75) 315–326.

Stuck B. J., Lenski M., Böhm M., Laufs U. (2008). Metabolic switch and hypertrophy of cardiomyocytes following treatment with angiotensin II are prevented by AMP-activated protein kinase. *J Biol Chem.* (283) 32562–32569.

synthase in cardiac sarcoplasmic reticulum. *Proc Natl Acad Sci U S A* (96) 657–62.

Tsutsumi, Y., Matsubara, H., Masaki, H., Kurihara, H., Murasawa, S., Takai, S., ... Iwasaka, T. (1999). Angiotensin II type 2 receptor overexpression activates the vascular kinin system and causes vasodilation. *The Journal of Clinical Investigation*, 104(7), 925–35.

Welches, W. R., Brosnihan, K. B., & Ferrario, C. M. (1993). A comparison of the properties and enzymatic activities of three angiotensin processing enzymes: angiotensin converting enzyme, prolyl endopeptidase and neutral endopeptidase 24.11. *Life Sciences*, 52(18), 1461–80.

Wilkins B. J., Dai Y. S., Bueno O. F., Parsons S. A., Xu J., Plank D. M., Jones F., Kimball T. R., Molkentin J. D. (2004), Calcineurin/NFAT coupling participates in pathological, but not physiological, cardiac hypertrophy. *Circulation Research* (94) 110 – 118.

Wollert K. C., Drexler H. (1999). The renin–angiotensin system and experimental heart failure. *Cardiovascular Research* (43) 838–849.

Xu K. Y., Huso D. L., Dawson T. M., Bredt D. S., Becker L. C. (1999). Nitric oxide synthase in cardiac sarcoplasmic reticulum. *Proc Natl Acad Sci U S A* (96) 657–62.