



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

MÁRIO DE MORAIS E SILVA

**EFEITO DA ALAMANDINA NO REMODELAMENTO CARDÍACO INDUZIDO PELA
CONSTRIÇÃO DA AORTA TRANSVERSA EM CAMUNDONGOS**

BELO HORIZONTE, MG

2018

MÁRIO DE MORAIS E SILVA

**EFEITO DA ALAMANDINA NO REMODELAMENTO CARDÍACO INDUZIDO PELA
CONSTRIÇÃO DA AORTA TRANSVERSA EM CAMUNDONGOS**

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 obtenção do título de Mestre.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Rafaela Fernandes da Silva

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

BELO HORIZONTE, MG

2018

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Fisiologia Renal e no Laboratório de Sinalização Intracelular em Cardiomiócitos, ambos 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 de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e da Fundação de Amparo à Pesquisa do estado de Minas Gerais (FAPEMIG).

*“A liberdade, que é uma conquista, e não uma
doação, exige permanente busca. Busca permanente
que só existe no ato responsável de quem a faz.
Ninguém tem liberdade para ser livre: pelo contrário,
luta por ela precisamente porque não a tem. Ninguém
liberta ninguém, ninguém se liberta sozinho, as
pessoas se libertam em comunhão”.*

Paulo Freire

Aos meus pais, Mário Elias e Carmelita
Silva, pelo apoio e amor incondicional!

Agradecimentos

À Prof^a. Rafaela, minha orientadora, pela confiança depositada em meu trabalho, pelas muitas horas de conversa e orientação, pela paciência com as peculiaridades da minha personalidade, pelo bom humor do dia-a-dia e por servir de inspiração de profissionalismo, competência e determinação.

Ao Prof. Robson, por ter cedido espaço entre seus muitos alunos e contribuído para realização desse trabalho.

À Prof^a Sílvia Guatimosim, igualmente importante para a realização desse projeto, por ter cedido espaço e possibilitado a realização de experimentos essenciais para conclusão do trabalho.

À Prof^a Maria Aparecida, pela atenção e carinho desde o início da minha caminhada no mundo acadêmico.

Aos meus amigos do departamento de fisiologia, em especial ao Hugo Seeman, por ter me apresentado e auxiliado no início da minha jornada acadêmica, ao Itamar Couto, por compartilhar um pouco do seu vasto conhecimento técnico e pelas ricas contribuições intelectuais, à Melissa Santuchi, pelo seu foco organizacional que sempre ajudou a todos, à Leda Maria, pelas sempre bem humoradas discussões e incríveis contribuições intelectuais, ao Ildernandes Vieira, pelo carinho e os conselhos sempre cheios de atenção.

Ao meu amigo Fernando Pedro, pela contribuição imprescindível na realização desse trabalho. Agradeço a paciência e a tolerância. Amizade como Batman e Robin, Frodo Baggins e Samwise Gamgee, Luke Skywalker e Han Solo, João Grilo e Chicó.

Aos demais amigos que contribuíram de forma direta e indireta para a realização do projeto, em especial à Thaís Alcântara, pela realização da TAC, à Carol Borges, Gleissy Kelly, Thiago Frederico, ao IC Bruno, exemplos de determinação e comprometimento com a ciência.

Ao meu irmão Cássio Luige, pela força, pelo respeito e amizade nesses anos e nos muitos que virão.

À Jessica, pelo carinho, apoio, respeito, amizade, paciência e amor. “O tempo vai passar, os anos vão confirmar!”.

Aos membros da secretaria do PGFisFar, técnicos de laboratório, administrativos, bioteristas e o pessoal da limpeza.

A todos os pesquisadores que dedicaram suas vidas a ciência, desvendando os mistérios do universo, desnudando a natureza e fornecendo o conhecimento que ilumina os caminhos da humanidade.

Às agências de fomento, pelo apoio financeiro.

A todos, o meu muito obrigado!

Resumo

Introdução: A alamandina, um peptídeo formado pela descarboxilação do aspartato da Ang-(1-7) ou pela hidrólise da Ang A pela enzima conversora de angiotensina 2, foi identificada recentemente como o mais novo componente do sistema renina-angiotensina (SRA). Através da interação com seu receptor, MrgD, a alamandina mostrou efeitos cardioprotetores. Embora seja bem conhecido o envolvimento de vários componentes do SRA clássico na gênese e progressão do remodelamento cardíaco, pouco se sabe sobre os efeitos da alamandina. **Objetivo:** Avaliar os efeitos da alamandina no remodelamento cardíaco induzido pela constrição da aorta transversa (TAC) em camundongos. **Materiais e Métodos:** Foram utilizados camundongos C57BL/6J machos selvagens entre 10-12 semanas e média de peso de 23g (CEUA 349/2016). Para o procedimento experimental os animais foram divididos nos grupos SHAM (falso operados), TAC (operados) e TAC+ALA (operados e tratados com alamandina - 30 µg/kg/dia, via gavagem). Após 14 dias de tratamento, os animais foram submetidos à ecocardiografia e eutanasiados para coleta do ventrículo esquerdo (VE). **Resultados:** O resultado histológico demonstrou que a administração oral de alamandina impede o desenvolvimento de hipertrofia celular e reduz a deposição de colágeno total e perivascular, avaliados através do tricrômico de Masson. Através do DHE demonstramos que a alamandina reduz a produção de espécie reativas de oxigênio (EROs) no VE dos animais, 14 dias após a TAC. Através de western blot demonstramos que a alamandina diminui a expressão e fosforilação de marcadores conhecidos do remodelamento cardíaco induzidos pela TAC, como a ERK1/2, TGF-β e MMP-2. Os resultados sugerem ainda, um aumento no desempenho da maquinaria de Ca²⁺ intracelular provocado pelo tratamento com alamandina, pois além de promover uma expressão elevada da SERCA2, aumentou os níveis de fosforilação da fosfolambam (PLN) Thr17. **Conclusões:** Nossos resultados mostraram que o tratamento oral com alamandina reduz alterações em diferentes parâmetros associados ao remodelamento ventricular induzidos pela TAC e apresenta efeitos anti-hipertróficos, anti-fibróticos, reduz a expressão de marcadores clássicos do remodelamento cardíaco, aumenta a expressão da SERCA2 e eleva os níveis de fosforilação da PLN. Portanto este trabalho ajuda a compreender o papel da alamandina no remodelamento cardíaco induzido pela sobrecarga de pressão e fornece base para o desenvolvimento de novos estudos que esclareçam o papel desse peptídeo nas doenças cardiovasculares.

Palavras chave: Remodelamento cardíaco, sistema renina-angiotensina, alamandina, MrgD, TAC.

Abstract

Introduction: Alamandine, a peptide formed by the decarboxylation of Ang-(1-7) aspartate or by the hydrolysis of Ang A by the angiotensin-converting enzyme 2, has recently been identified as the newest component of the renin-angiotensin system (RAS). Through interaction with its receptor, MrgD, alamandine showed cardioprotective effects. Although the involvement of various components of classical RAS in the genesis and progression of cardiac remodeling is well known, little is known about the effects of alamandine. **Objective:** To evaluate the effects of alamandine on cardiac remodeling induced by transverse aortic constriction (TAC) in mice. **Materials and Methods:** Male wild-type C57BL/6J mice were used between 10-12 weeks and 23g mean weight (CEUA 349/2016). For the experimental procedure, the animals were divided into SHAM (operated), TAC (operated) and TAC + ALA (operated and treated with alamandine - 30 µg / kg / day, by gavage). After 14 days of treatment, the animals were submitted to echocardiography and euthanized for collection of the left ventricle (LV). **Results:** The histological result demonstrated that the oral administration of alamandine prevents the development of cellular hypertrophy and reduces the deposition of total and perivascular collagen, evaluated through the Masson trichrome. Through DHE, we demonstrated that alamandine reduces the production of reactive oxygen species (ROS) in the LV of the animals, 14 days after the TAC. Through western blot analysis we have demonstrated that alamandine decreases the expression and phosphorylation of known TAC-induced markers of cardiac remodeling, such as ERK1/2, TGF-β and MMP-2. The results also suggest an increase in the performance of the intracellular Ca²⁺ machinery provoked by the treatment with alamandine, in addition to promoting a high expression of SERCA2, increased the phosphorylation levels of phospholamban (PLN) Thr17. **Conclusions:** Our results showed that oral treatment with alamandine reduces changes in different parameters associated with TAC-induced ventricular remodeling and has anti-hypertrophic, anti-fibrotic effects, reduces expression of classic markers of cardiac remodeling, increases expression of SERCA2 and increases the phosphorylation levels of PLN. Therefore, this work helps to understand the role of alamandine in cardiac remodeling induced by pressure overload and provides a basis for the development of new studies that clarify the role of this peptide in cardiovascular diseases.

Keywords: Cardiac remodeling, renin-angiotensin system, alamandine, MrgD, TAC.

Lista de Figuras

Figura 1. Alterações na geometria cardíaca	11
Figura 2. Modelo de constrição da aorta transversa	16
Figura 3. Vias de sinalização do sistema renina angiotensina	18
Figura 4. Efeitos comparados entre angiotensina (1-7) e alamandina	20
Figura 5. Procedimentos experimentais e fluxograma de tempo	25
Figura 6. Representação do processo de isolamento do coração e do arco aórtico nos camundongos C57BL/6J submetidos à TAC	26
Figura 7. Redução no diâmetro da aorta transversa após a TAC.....	32
Figura 8. Alterações no gradiente de pressão aórtico após a TAC	33
Figura 9. Representação qualitativa das alterações hemodinâmicas no arco aórtico provocadas pela TAC	33
Figura 10. Efeito da administração oral de alamandina nas alterações morfométricas celulares	36
Figura 11. A administração oral de alamandina normaliza a fosforilação da ERK1/2 induzida pela TAC	37
Figura 12. Efeito da administração oral de alamandina no processo fibrótico desenvolvido em resposta à TAC	39
Figura 13. Efeitos da TAC e da administração oral de alamandina na expressão do TGF- β	40
Figura 14. Variações no padrão de expressão da MMP-2 em função da TAC e da administração oral de alamandina	41
Figura 15. A TAC e a administração oral de alamandina alteram de forma distinta o padrão de expressão da SERCA2 e fosforilação da PLN	43
Figura 16. Efeitos da TAC e da administração oral de alamandina na produção de EROs no VE	44

Lista de Tabelas

Tabela 1. Grupos e procedimentos experimentais	24
Tabela 2. Parâmetros morfofuncionais cardíacos após 2 semanas de TAC	35

Lista de Abreviações

1R1C	Modelo experimental de hipertensão “1 rim 1 clipe”
2R1C	Modelo experimental de hipertensão “2 rins 1 clipe”
AGT	Angiotensinogênio
Akt	Proteína quinase B
AMPc	Monofosfato cíclico de adenosina
AMPK- α	Proteína quinase ativada por AMP alfa
Ang A	Angiotensina A
Ang I	Angiotensina I
Ang II	Angiotensina II
Ang-(1-7)	Angiotensina-(1-7)
Ang-(1-9)	Angiotensina-(1-9)
ANOVA	Análise de variância
ANP	Peptídeo natriurético atrial
Ala ¹ -Ang-(1-7)	Alamandina
AT ₁	Receptor de angiotensina II do tipo 1
AT ₂	Receptor de angiotensina II do tipo 2
BNP	Peptídeo natriurético cerebral
CEBIO	Centro de bioterismo
CVLM	Medula ventrolateral caudal
DCV	Doenças cardiovasculares
DHE	Dihidroetídio
D-Pro ⁷ -Ang-(1-7)	D-Pro ⁷ -angiotensina-(1-7)
ECA	Enzima conversora de angiotensina
ECA2	Enzima conversora de angiotensina 2
EGF	Fator de crescimento epididimal
EPM	Erro padrão da média
ERK1/2	Quinase regulada por sinal extracelular 1/2
EROs	Espécies reativas de oxigênio
FGF	Fator de crescimento de fibroblasto
HE	Hematoxilina e Eosina
HP β CD	2-Hidroxipropil- β -ciclodextrina
IGF	Fator de crescimento semelhante à insulina

MAPK	Proteína quinase ativada por mitógeno
MEC	Matriz extracelular
MHC- β	Miosina de cadeia pesada do tipo β
MMP-2	Metaloproteinase de matriz do tipo 2
MMP-9	Metaloproteinase de matriz do tipo 9
MMPs	Metaloproteinases de matriz
MrgD	Receptor acoplado à proteína G relacionado ao Mas do tipo D
mRNA	Ácido ribonucleico mensageiro
NEP	Endopeptidase neutra
NF κ B	Fator nuclear kappa B
NO	Óxido nítrico
OMS	Organização Mundial de Saúde
OPAS	Organização Pan-Americana de Saúde
PEP	Prolil endopeptidase
PI3K	Fosfoinosítideo 3-quinase
PKA	Proteína quinase A
PKC	Proteína quinase C
PLN	Fosfolambam
PRR	Receptor de (pro)renina
RNA	Ácido ribonucleico
SHR	Ratos espontaneamente hipertensos
SERCA	Bomba de Ca ²⁺ ATPase do retículo sarcoplasmático
SRA	Sistema renina-angiotensina
TAC	Constricção da aorta transversa
TAC+ALA	Animais operados e submetidos à administração de alamandina
TGF- β	Fator de crescimento e transformação-beta
VCV	Ventilação controlada por volume

Sumário

Resumo	1
Abstract	2
Lista de figuras	3
Lista de tabelas	4
Lista de abreviações	5
1. Introdução	9
1.1 Doenças Cardiovasculares	9
1.2 Remodelamento Cardíaco	9
1.2.1 Constrição da Aorta Transversa	14
1.3 Sistema Renina-Angiotensina	16
1.3.1 Alamandina.....	18
1.4 O Sistema Renina-Angiotensina e o Remodelamento Cardíaco	21
2. Objetivos	23
2.1 Objetivo geral	23
2.2 Objetivos específicos	23
3. Metodologia	24
3.1 Animais.....	24
3.2 Constrição da aorta transversa	25
3.3 Administração oral de alamandina	26
3.4 Ecocardiograma	27
3.5 Eutanásia	27
3.6 Análises histomorfométricas	28
3.7 Avaliação da deposição de colágeno total e perivascular	28
3.8 Identificação de proteínas e western blot	29
3.9 Ensaio de imunofluorescência	30
3.10 Mensuração das espécies reativas de oxigênio	31
3.11 Análise estatística	31
4. Resultados	32
4.1 Alterações hemodinâmicas no arco aórtico 14 dias após a TAC	32

4.2 Efeitos da administração oral de alamandina nos parâmetros morfológicos e funcionais cardíacos 14 dias após a TAC	34
4.3 A administração oral de alamandina impede a hipertrofia dos cardiomiócitos ventriculares induzida pela TAC	36
4.4 A administração oral de alamandina normaliza a deposição de colágeno total e perivascular induzida pela TAC.....	38
4.5 A administração oral de alamandina promove aumento na expressão e fosforilação de SERCA2 e PLN	42
4.6 A administração oral de alamandina reduz a produção de EROs induzida pela TAC	43
5. Discussão	45
6. Conclusões	52
7. Perspectivas	53
8. Referências bibliográficas	54

1. Introdução

1.1 Doenças cardiovasculares

As doenças cardiovasculares (DCV) são a principal causa de morte no mundo. De acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS), 17,5 milhões de pessoas morrem todos os anos em decorrência de alguma doença relacionada a esse sistema, o que representa aproximadamente 31% de todas as mortes no mundo (OMS, 2016). A Organização Pan-Americana de Saúde (OPAS) destaca que só no Brasil, 300 mil pessoas sofrem infartos todos os anos e que 30% desses ataques cardíacos são fatais (OPAS, 2017). Ainda de acordo com a OMS (2016), 80% dos óbitos estão associados ao acidente vascular encefálico e ao infarto agudo do miocárdio, causados pela soma de fatores de risco, como: tabagismo, dietas inadequadas, obesidade, sedentarismo, consumo excessivo de álcool, diabetes, hiperglicemia e hipertensão.

Além do custo inestimável de vidas humanas, as DCV impactam também na economia dos países. Um estudo de 2017, realizado por Siqueira *et al.*, demonstrou que em 2015 o gasto direto do setor público no Brasil associado às DCV (consultas cardiológicas, internações, cirurgias e implantes de dispositivos), foi de mais de 5 bilhões de reais (Siqueira *et al.*, 2017). Esses dados, associados à alta morbidade e mortalidade das DCV, evidenciam a importância de investimentos em pesquisas que esclareçam os mecanismos associados a fisiologia e patologia desse sistema e forneçam terapias que ajudem a sanar esse mal.

1.2 Remodelamento cardíaco

O remodelamento cardíaco caracteriza-se como um conjunto de alterações moleculares, neuro-humorais, celulares, gênicas e intersticiais que se manifestam clinicamente como modificações no tamanho, massa, geometria e função do coração, em resposta a uma lesão aguda ou por sobrecarga crônica (Jessup M. *et al.*, 2007). Esse processo pode ser reversível, se o diagnóstico for precoce e a causa suprimida ou atenuada (Swynghedauw *et al.*, 1999).

As alterações moleculares e estruturais cardíacas podem ser fisiológicas e adaptativas durante o desenvolvimento normal ou em atletas (Sutton *et al.*, 2000). No entanto, o termo é amplamente usado para descrever alterações patológicas, comuns

a múltiplas agressões ao coração, como a lesão por isquemia (infarto agudo do miocárdio), sobrecargas crônicas de pressão (hipertensão arterial ou estenose aórtica) ou de volume (insuficiência mitral ou aórtica), inflamação (miocardites) ou alterações na expressão genética, que podem levar a miocardiopatias (Remme *et al.*, 2003). Na hipertrofia cardíaca, por exemplo, o coração apresenta aumento no tamanho dos cardiomiócitos e proliferação anormal de células não musculares, enquanto nos quadros de fibrose, observa-se a deposição excessiva de elementos da matriz extracelular (MEC), acompanhada de proliferação e alteração fenotípica de fibroblastos para miofibroblastos, que podem modificar a morfologia do coração e causar disfunção nesse órgão (Levy *et al.*, 1990).

O coração é um órgão dinâmico e pode executar mecanismos compensatórios quando há aumento nas necessidades metabólicas e elevação na carga de trabalho. Entre esses mecanismos estão, (I) o aumento da massa muscular e deposição de elementos intersticiais, para suportar a sobrecarga hemodinâmica (Imamura *et al.*, 1994), (II) alterações na contratilidade cardíaca (Wikman-Coffelt *et al.*, 1979) e (III) aumento na força de contração em resposta ao maior retorno venoso, de acordo com a lei de Frank-Starling (Gunther *et al.*, 1979). Em quadros de sobrecarga hemodinâmica crônica, o segundo mecanismo passa a ser prejudicial como um ajuste permanente e o terceiro torna-se limitado. Dessa forma, o remodelamento estrutural é o mecanismo principal na reparação da sobrecarga hemodinâmica (Lorell *et al.*, 2000).

Em resposta ao estresse biomecânico crônico, como em quadros de estenose aórtica, hipertensão ou insuficiência mitral, a hipertrofia cardíaca pode se tornar patológica e desenvolver-se como concêntrica ou excêntrica. Na hipertrofia concêntrica, que acontece por sobrecarga de pressão, ocorre adição de sarcômeros em paralelo, que provocam um aumento na largura dos miócitos, que por sua vez aumentam a espessura na parede do coração e reduzem o estresse parietal, de acordo com a lei de Laplace (Frohlich *et al.*, 1992). Nos casos de hipertrofia excêntrica, ocorre aumento no comprimento da célula em função da adição de sarcômeros organizados em série, que ocorre normalmente devido à sobrecarga de volume, como observado na insuficiência aórtica (Olsen e cols., 2013) (figura 1).

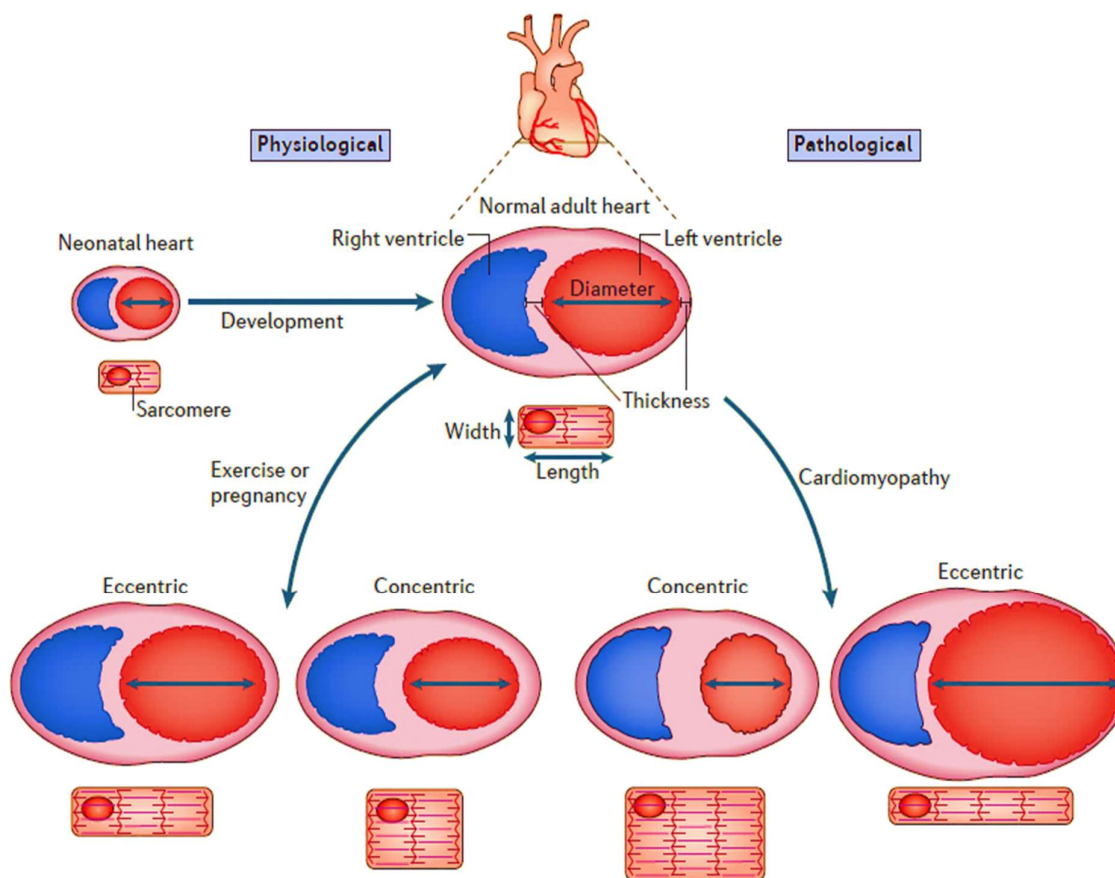


Figura 1: Alterações na geometria cardíaca. O coração é um órgão dinâmico que pode alterar sua geometria em resposta a diferentes estímulos. A hipertrofia cardíaca reduz o estresse parietal e segue a lei de Laplace, em que a tensão na parede é uma função inversa da espessura [tensão = (pressão x raio) / 2 x espessura da parede)]. Adaptado de Mailliet *et al.*, 2013

As alterações teciduais nos metazoários, em resposta às mudanças ambientais ou durante o desenvolvimento, ocorrem em função da secreção de proteínas e peptídeos que servem de mediadores para a comunicação celular (Massague *et al.*, 1990). O coração é um órgão que sofre variações ambientais constantes e responde ao estresse neuro-humoral e mecânico. As alterações hemodinâmicas provocadas pela elevação no gradiente médio de pressão, estimula uma ampla gama de vias de sinalização, que resultam no remodelamento e podem levar à insuficiência cardíaca (Frey *et al.*, 2003).

A sobrecarga de trabalho provoca ativação de vias de sinalização no tecido cardíaco que estimulam moléculas-alvo e promovem alterações na transcrição gênica, resultando em síntese de proteínas envolvidas na hipertrofia celular e modificação dos

componentes da MEC (Backs *et al.*, 2009). As alterações na MEC configuram-se como modificações no perfil molecular e acúmulo patológico de moléculas, resultado do desequilíbrio entre a síntese e a degradação, causando a fibrose intersticial difusa e a fibrose perivascular, que provoca rigidez do ventrículo com prejuízo na função diastólica e sistólica, além de redução na complacência dos vasos coronarianos, com possível redução do fluxo e isquemia miocárdica (Cohn *et al.*, 2000). O colágeno é uma proteína responsável pela regulação da distensibilidade, transmissão de força ao longo do ciclo cardíaco e resistência a deformações patológicas, embora o acúmulo excessivo esteja associado à fibrose reparativa ou reativa (Matsubara *et al.*, 2003). Na reparativa a deposição de colágeno ocorre após a necrose celular e a consequente reação inflamatória resultante da sobrecarga hemodinâmica e outros insultos ao coração, enquanto a fibrose reativa ocorre em resposta a ativação neuro-humoral (angiotensina II, aldosterona e endotelina-1), sem haver necrose do tecido miocárdico (Willenheimer *et al.*, 2000).

A transdução do estímulo mecânico no tecido cardíaco ocorre por canais iônicos sensíveis ao estiramento, secreção de substâncias parácrinas e autócrinas, mas principalmente através das integrinas, que são proteínas de membrana que conectam o citoesqueleto à MEC (Franchini *et al.*, 2001). A estrutura tridimensional da MEC associada às integrinas transmite força e tensão para as estruturas intracelulares, e assim, o complexo integrina/ citoesqueleto fornece a base física para a conversão do sinal mecânico em sinal bioquímico, composto por moléculas presentes no espaço intracelular (Maniotis *et al.*, 1997; Janmey *et al.*, 1998). Após a alteração no padrão de transcrição gênica induzida por moléculas associadas ao complexo das integrinas, como a *protein kinase B* (PKB), fosfoinositide 3-kinase (PI3K), *extracellular-signal-regulated kinase 1/2* (ERK1/2), , *nuclear factor kappa B* (NF- κ B), *c-Jun N-terminal kinase* (JNK) e a via do *transforming growth factor β* (TGF- β), ativadas pela deformação na membrana celular provocada pelo estímulo mecânico, ocorre a reativação na expressão de genes fetais (Frank *et al.*, 2008). Esses genes codificam proteínas, como *beta-myosin heavy chain* (β -MHC), *α -actin*, *atrial natriuretic peptide* (ANP) e *brain natriuretic peptide* (BNP), associadas à hipertrofia, proliferação e inibição de apoptose (Frank *et al.*, 2008; Taegtmeyer *et al.*, 2010). A sobrecarga hemodinâmica também provoca liberação de outros fatores pelas células cardíacas, como a endotelina 1, *fibroblast growth factor* (FGF), *insulin-like*

growth factor (IGF), espécies reativas de oxigênio (EROs) e a angiotensina II (Ang II) e, que podem se ligar à receptores de membrana e ativar cascatas de sinalização associadas a calcineurina, fosfoquinase-C e à via das *mitogen activated protein kinases* (MAPK), resultando em amplificação das respostas hipertróficas e associadas ao remodelamento (Garcia *et al.*, 2008).

As MAPK são quinases pertencentes a uma extensa via compostas por diversas proteínas que transmitem sinais do meio extracelular, através de receptores na superfície, para o núcleo (Purcell *et al.*, 2007). Uma das proteínas dessa via é a ERK1/2, uma quinase que pode ser ativada por receptores acoplados a proteínas G (Ang II e endotelina-1), receptores tirosina quinase (TGF- β , FGF e o IGF-1), além do estiramento das células provocado pelo estresse biomecânico (Sugden *et al.*, 1998). Essa quinase é expressa de forma ubíqua e possui múltiplas ações, como regulação do ciclo celular, crescimento, proliferação, diferenciação, citocinese, formação dos microtúbulo e das junções GAP, senescência e transcrição gênica (Rose *et al.*, 2010).

O TGF- β é uma citocina pleiotrópica pertencente a uma superfamília de fatores de crescimento, diferenciação e morfogênese, que possui papel central na manutenção da MEC em diferentes órgãos (Massague *et al.*, 1987). Muitos estudos já demonstraram que o TGF- β é capaz de provocar alterações estruturais no miocárdio em condições de sobrecarga pressórica, ao promover hipertrofia celular, síntese de componentes da MEC, recrutamento de células não musculares e alteração fenotípica de fibroblastos para miofibroblastos (Brand *et al.*, 1995; Brooks *et al.*, 2000; Witt *et al.*, 2002).

As alterações na estrutura cardíaca que caracterizam o remodelamento, envolvem também alterações na razão entre a expressão das metaloproteinases de matriz (MMPs) e seus inibidores. As MMPs são enzimas com atividade proteolítica pertencentes a uma família de 20 proteínas dependentes de zinco e cálcio, que em conjunto podem degradar todos os componentes da matriz (Raffetto *et al.*, 2008). Essas proteínas estão associadas ao processo fibrótico, pois participam da degradação e deposição dos componentes da MEC ao promoverem acúmulo de fragmentos de colágeno que estimulam a produção de mais colágeno pelos fibroblastos (Raffetto *et al.*, 2008). Essas enzimas podem ser encontradas no tecido cardíaco em condições fisiológicas sendo, portanto, consideradas constitutivas, como a MMP-2, embora em condições de estresse haja uma elevação em sua expressão.

Outras são produzidas por tipos específicos de células em condições patológicas, como a MMP-9, produzida por células inflamatórias como neutrófilos e macrófagos (Guimarães *et al.*, 2010; Guimarães & Castro, 2015).

Diferentes estudos têm demonstrado que a sobrecarga pressórica promove alterações na expressão dos elementos associados à performance contrátil do tecido cardíaco (Gelsomino *et al.*, 2013; Anwar *et al.*, 2008). A contratilidade cardíaca está associada a atividade da *sarco/endoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase* (SERCA) e da *phospholamban* (PLN), que são proteínas importantes no balanço do Ca²⁺ a partir do retículo sarcoplasmático (RS) no meio intracelular (Bers *et al.*, 2002). Durante a contração há liberação de Ca²⁺ do RS para meio intracelular e a recaptação é feita pela SERCA. A PLN é responsável por regular a atividade da SERCA em seu estado basal e ao ser fosforilada permite que a SERCA faça a recaptação do Ca²⁺ promovendo o relaxamento das fibras, ou seja, a fosforilação da PLN tem caráter inibitório (Bers *et al.*, 2000).

O remodelamento cardíaco tem sido estudado em diferentes modelos experimentais que mimetizam diversas doenças cardiovasculares humanas como hipertensão arterial, estenose aórtica, hipertrofia e insuficiência cardíaca. A utilização desses modelos permite um melhor entendimento da fisiopatologia das doenças cardíacas, possibilitando o estudo da evolução dessas doenças a partir de seus estágios iniciais. Nos modelos *in vivo* a hipertrofia cardíaca pode ser induzida experimentalmente após o infarto do miocárdio, pelo tratamento hormonal ou simpatomimético (Vassallo *et al.*, 1988; Brown *et al.*, 1992), ou por origem genética, como nos *spontaneously hypertensive rats* (SHR) (Aoki *et al.*, 1972). A hipertrofia pode também ser induzida em modelos de hipertensão, através da cirurgia de 1 rim 1 clipe (1R1C) (Vassallo *et al.*, 1988), 2 rins 1 clipe (2R1C) (Ferrario *et al.*, 1984), acetato de deoxicorticosterona (DOCA-Sal) (Brownie *et al.*, 1990), hipertensão neurogênica induzida por deservação sino-aórtica (Vassallo *et al.*, 1991) e a coarctação ou constrição da aorta (Ventura-Clapier *et al.*, 1988; Rockman *et al.*, 1991).

1.2.1 Constrição da aorta transversa

A constrição da aorta transversa (TAC) em camundongos é uma técnica normalmente utilizada para avaliar a hipertrofia ventricular esquerda e a insuficiência cardíaca induzidas por sobrecarga de pressão, bem como elucidar as vias de

sinalização envolvidas nesses processos. Embora a TAC inicialmente promova uma hipertrofia compensatória, comumente associada ao aumento na expressão de elementos contráteis no coração, ao longo do tempo, em resposta à sobrecarga crônica, os ajustes não são adequados a essa condição, culminando na dilatação e na insuficiência cardíaca (Heineke *et al.*, 2006). Desenvolvida em 1991 por Rockman *et al.*, para avaliar os mecanismos envolvidos na ativação da expressão gênica do ANP, durante a hipertrofia induzida por sobrecarga de pressão, essa técnica tem sido desde então extensivamente utilizada como ferramenta para mimetizar doenças cardiovasculares humanas em modelos animais (figura 2). Comparada aos outros modelos experimentais de hipertrofia e insuficiência cardíaca, como os modelos de infarto ou hipertensão, a TAC fornece um modelo mais reprodutível da hipertrofia e um curso temporal mais gradual no desenvolvimento da insuficiência cardíaca (van Oort *et al.*, 2010).

Rockman *et al.* observaram um aumento na área transversal total dos cardiomiócitos provocado pela sobrecarga de pressão gerada pela TAC, e desde então, inúmeros trabalhos avaliam a hipertrofia ventricular esquerda e suas implicações através desse modelo (Harada *et al.*, 1998; Musumeci *et al.*, 2011; Mohammed *et al.*, 2012; Hu *et al.*, 2016). Embora a hipertensão grave e súbita causada pela TAC tenha relevância clínica limitada, esse modelo de sobrecarga de pressão é importante para indução e estudo do remodelamento cardíaco, pois possui mortalidade aceitável (10%) e uma taxa de sucesso acima de 70% (Ichinose *et al.*, 2003). Além disso, a barreira mecânica formada pela constrição parcial reduz o diâmetro e gera um gradiente de pressão entre o VE e a aorta que pode ser quantificado e modificado de acordo com o grau de constrição e as condições hemodinâmicas. Esse gradiente causa uma hipertensão aguda e provoca um aumento na massa do VE, disfunção e insuficiência cardíaca, embora o tempo varie de acordo com as condições experimentais (Rockman *et al.*, 1991).

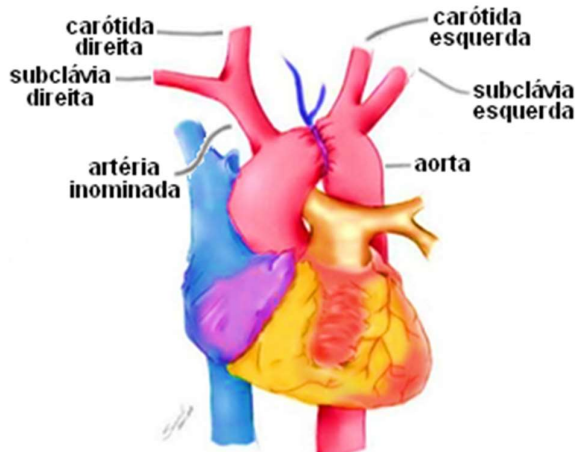


Figura 2: Modelo ilustrado da cirurgia de TAC. A TAC consiste na constrição da aorta transversa, localizada entre a artéria inominada, que origina as artérias subclávia e carótida direita e a carótida esquerda.

1.3 Sistema renina-angiotensina

O sistema renina-angiotensina (SRA) é um regulador importante da pressão arterial e do balanço hidroeletrólítico, além de manter a estrutura e função do sistema cardiovascular e renal (Griendling *et al.*, 1993). Presente em todos os vertebrados, o SRA é um sistema complexo e dinâmico, composto de diversos peptídeos, enzimas e receptores (Fournier *et al.*, 2012). Caracterizado como um sistema endócrino, hoje sabe-se que ele pode atuar de forma autócrina e parácrina em diferentes órgãos, incluindo o coração (Bader *et al.*, 2001).

O SRA foi descrito inicialmente como uma via proteolítica contendo um único produto ativo final, a Ang II. Pertencente ao chamado eixo clássico, a Ang II é considerada um dos principais efetores desse sistema, responsável pelo aumento na pressão arterial, produção de EROs, inflamação, hipertrofia e proliferação celular, fibrose e outras alterações teciduais. A via clássica começa com o angiotensinogênio (AGT) produzido no fígado ou sintetizado localmente em diversos tecidos (Campbell *et al.*, 1987). O AGT é o substrato bioquímico para todos os peptídeos do SRA e é clivado pela renina, sintetizada nos rins ou localmente em diferentes órgãos como cérebro, adrenais e coração (Tigerstedt & Bergman, 1988; Gonzalez *et al.*, 2015). A hidrólise do AGT produz a angiotensina I (Ang I), que é um decapeptídeo clivado pela enzima conversora de angiotensina (ECA) para formar a Ang II, embora possa ser clivado também por outras enzimas e formar outros peptídeos do SRA (Griendling *et al.*, 1993). As ações da Ang II são mediadas pelos receptores AT₁ e AT₂, que são pertencentes a uma superfamília de receptores acoplados à proteína G (Tsutsumi *et al.*, 1991; Galandrin *et al.*, 2016).

Inúmeros trabalhos revelaram que o SRA é mais complexo do que a via linear descrita inicialmente (figura 3). Em 1988, por exemplo, Santos *et al.* descreveram pela primeira vez a presença da angiotensina (1-7) [Ang-(1-7)] em cérebro de cães, mesmo na presença de inibidores da ECA, evidenciando a formação de um novo peptídeo, independente da via clássica já descrita (Santos *et al.*, 1988). Esse heptapeptídeo pode ser formado pela ação da ECA2 sobre a Ang I, que origina a angiotensina (1-9), que por sua vez é convertida em Ang-(1-7), pela ação da ECA. As enzimas *prolyl oligopeptidase*, *thimet oligopeptidase* e *neprilisin* também exercem essa função e clivam a Ang I para formar Ang-(1-7) (Ferrario *et al.*, 2010). Esse peptídeo ainda pode ser formado a partir da Ang II pela ação da ECA2 (Donoghue *et al.*, 2000; Santos *et al.*, 2014). Em 2003, a Ang-(1-7) foi caracterizada como um peptídeo seletivo para o receptor Mas e, a partir de então, diferentes abordagens descreveram muitas ações da Ang-(1-7) em diversos órgãos (Santos *et al.*, 2003). Campagnole-Santos *et al.* demonstraram, por exemplo, os efeitos hipotensivos da Ang-(1-7) quando injetada no núcleo do trato solitário de ratos (Campagnole-Santos *et al.*, 1989). Os muitos estudos subsequentes descreveram ações do eixo ECA2/ Ang-(1-7)/ MasR, que contrabalanceiam o eixo clássico ECA/Ang II/AT₁, como efeitos anti-inflamatórios, antiproliferativos, antifibróticos, anti-hipertroóficos, antiarritmogênicos e mecanismos vasodilatadores (Santos *et al.*, 2008; McCollum *et al.*, 2012; Santos *et al.*, 2014). Além disso, um estudo recente demonstrou que a Ang-(1-7) age como ligante natural do receptor AT₁ e exerce efeitos cardioprotetores (Galandrin *et al.*, 2016).

Ao longo das últimas décadas o SRA revelou-se ainda mais complexo e sua via clássica foi se ramificando com a caracterização de novos peptídeos, como a angiotensina (1-12), angiotensina (2-8) e a angiotensina (3-8), alguns inclusive com ações biológicas já conhecidas (Santos *et al.*, 2008). Alguns desses peptídeos foram descritos mais recentemente, como angiotensina A (Ang A), um octapeptídeo semelhante a Ang II, com efeito vasoconstritor via receptor AT₁ (Jankowski *et al.*, 2007) e a alamandina, identificada e caracterizada em 2013 por Lautner *et al.*.

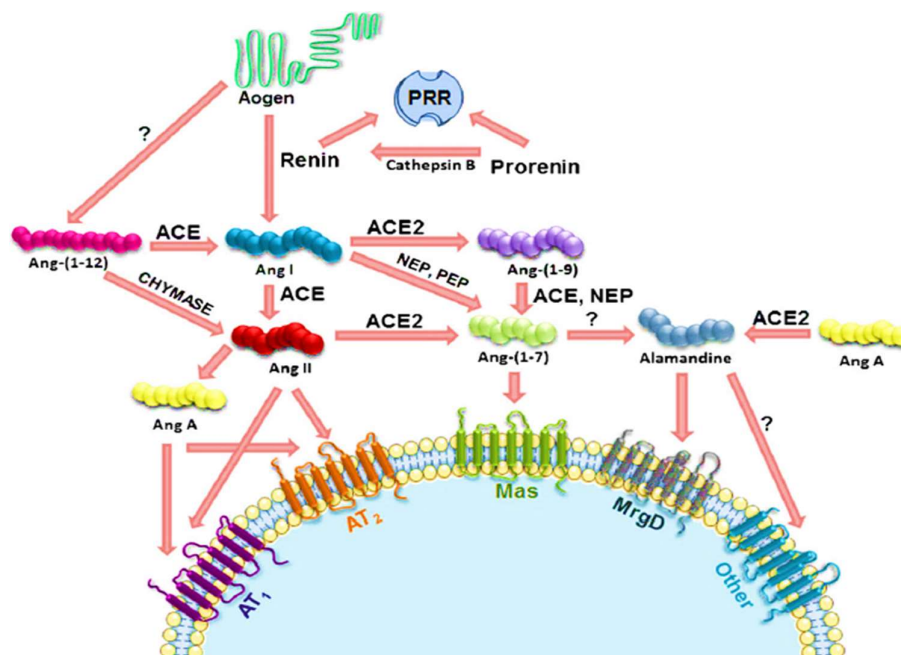


Figura 3: Cascata de sinalização simplificada do SRA. O SRA é um sistema endócrino e tecidual complexo, composto de inúmeros peptídeos, enzimas e receptores, que em conjunto regulam as funções do sistema cardiovascular. **Aogen**: Angiotensinogênio; **PRR**: Receptor de (Pro)renina; **Ang**: Angiotensina; **ACE**: enzima conversora de angiotensina; **ACE2**: enzima conversora de angiotensina 2; **NEP**: endopeptidase neutra; **PEP**: prolil endopeptidase; **AT₁**: receptor de angiotensina do tipo 1; **AT₂**: receptor de angiotensina do tipo 2; **Mas**: receptor Mas da Ang-(1-7); **MrgD**: receptor Mas acoplado a proteína G do tipo D. Adaptado de Etelvino *et al.*, 2014

1.3.1 Alamandina

A [Ala¹-Ang-(1-7)] conhecida como alamandina, é um heptapeptídeo estruturalmente semelhante a Ang-(1-7), diferindo apenas em sua porção N-terminal, em que o aminoácido aspartato (Asp) é substituído pela alanina (Ala). Esse peptídeo pode ser formado a partir de diferentes substratos, como a Ang A que sofre hidrólise pela ACE2, ou a partir do Ang-(1-7), em que o resíduo do aminoácido Asp é descarboxilado dando origem a Ala (Etelvino *et al.*, 2014). Além da semelhança estrutural entre a alamandina e a Ang-(1-7), ambas são encontradas no sangue humano e possuem ações protetoras em diferentes tecidos, reduzindo a progressão e atenuando os danos causados pela pressão arterial elevada, caracterizados normalmente por fibrose, remodelamento, inflamação e vasoconstrição excessiva,

embora alguns efeitos sejam característicos de cada peptídeo (de Souza-Neto *et al.*, 2018) (figura 4).

Além das inúmeras ações da Ang-(1-7) através do receptor Mas, Gembart *et al.*, demonstraram que esse peptídeo é um agonista fraco para o receptor acoplado à proteína G relacionado ao Mas do tipo D (MrgD). Nesse mesmo estudo foi demonstrado que os Mrgs podem interagir com outros peptídeos do SRA (Gembart *et al.*, 2008). Pertencente a uma superfamília de receptores acoplados a proteína G (GPCRs) relacionados ao Mas, os Mrgs são subdivididos de acordo com a homologia de seus genes (Zhang *et al.*, 2005). Estruturalmente os Mrgs são altamente conservados e podem compartilhar algumas funções e formarem heterodímeros (Dong *et al.*, 2001; Milasta *et al.*, 2006). O MrgD foi descrito inicialmente por Dong *et al.* em neurônios nociceptivos de camundongos (Dong *et al.*, 2001), e desde então, tem sido encontrado em diferentes tecidos, incluindo o cardíaco (Zylka *et al.*, 2003). Oliveira (2016) demonstrou por imunofluorescência, a expressão proteica do MrgD no núcleo de cardiomiócitos de camundongos C57BL6/J e ratos Wistar (Oliveira 2016). Recentemente, de Jesus *et al.* mostraram a expressão gênica do MrgD em cardiomiócitos isolados de ratos neonatos e camundongos C57BL/6J adultos (de Jesus *et al.*, 2018). As ações da Ang-(1-7) através do receptor Mas e sua interação com o MrgD, levantou a possibilidade de que a alamandina pudesse se ligar a esses receptores, principalmente pela semelhança estrutural entre os dois peptídeos. O *ligand binding assays* (LBA) em células transfectadas com o MrgD, indicou que a alamandina interage com esse receptor e essa ligação é inibida pelo antagonista farmacológico do MrgD, D-Pro7-Ang-(1-7), e pelo aminoácido β -alanina, que também se liga ao MrgD (Lautner *et al.*, 2013; Shinohara *et al.*, 2013). Nesse contexto foi demonstrado que a alamandina possui efeitos vasodilatadores em camundongos nocaute para o receptor Mas e a utilização do antagonista do receptor Mas, A-779, não bloqueou seus efeitos em anéis de aorta de camundongos FVB/N, assim como, a alamandina não estimulou a liberação de NO em células transfectadas com o receptor Mas, efeito observado com a utilização de células transfectadas com o receptor MrgD (Lautner *et al.*, 2013).

Lautner *et al.* também demonstraram outros efeitos da alamandina, como a capacidade de modular a pressão sanguínea quando injetada em áreas medulares do cérebro e regular o barorreflexo. Quando incluída em HP- β ciclodextrina (HP β CD), a alamandina produziu efeito anti-hipertensivo de longa duração em ratos SHR. Por fim,

nesse mesmo trabalho de 2013, ficou demonstrado que a administração oral de alamandina incluída em HP β CD, na dose de 50 μ g/kg/dia, foi capaz de reduzir o acúmulo de colágeno I, III e fibronectina em ratos tratados com isoproterenol (Lautner *et al.*, 2013). Estudos mais recentes têm confirmado os resultados encontrados anteriormente. Soares *et al.*, demonstraram em 2017 o efeito hipotensivo da alamandina administrada na medula ventrolateral caudal (CVLM) de ratos submetidos ao modelo de hipertensão 2R1C. Nesse mesmo ano, Soltani *et al.* mostraram efeitos cardiovasculares diversos em ratos submetidos ao modelo 2R1C (Soltani *et al.*, 2017). Esses resultados que contrabalançam as ações deletérias já conhecidas do eixo clássico do SRA, associados ao fato da alamandina ter sido caracterizada a menos de uma década, estimulam, portanto, o desenvolvimento de novos trabalhos para elucidar o papel desse peptídeo na fisiologia e nas doenças do sistema cardiovascular.

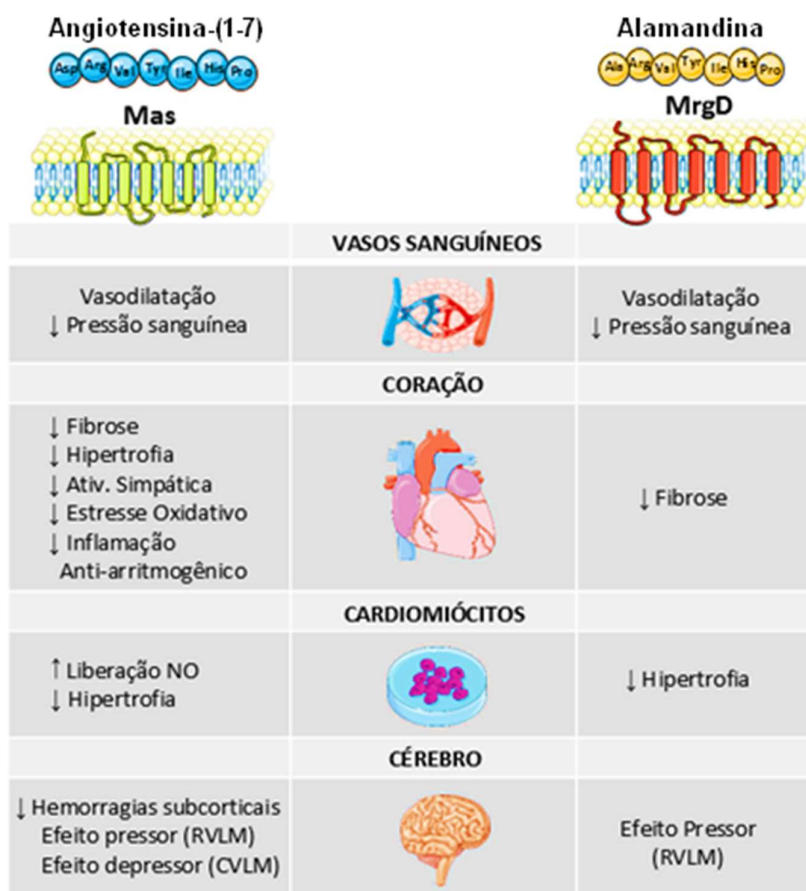


Figura 4: Efeitos comparativos entre a Ang-(1-7) e alamandina. Adaptado de Souza-Neto (2018).

1.4 O Sistema Renina-Angiotensina e o Remodelamento Cardíaco

O SRA é extensamente estudado no coração, pois o tecido cardíaco expressa todos os componentes desse sistema, além de ser fundamental para homeostase, devido à sua participação na regulação do equilíbrio hidroeletrolítico, pressão arterial, tônus vascular e no remodelamento cardíaco (Mendoza-Torres *et al.*, 2015). Ao longo das últimas décadas, muitos estudos evidenciaram a complexidade e importância do SRA na manutenção das funções cardiovasculares. Na década de 90 muitos trabalhos elucidaram as ações locais desse sistema e sua importância para a fisiologia cardiovascular (Johnston *et al.*, 1992; Stock *et al.*, 1995; Iwai *et al.* 1995; Seneri *et al.* 1996). Nesse mesmo período, diferentes grupos de pesquisa descreveram outros componentes do SRA, com efeitos cardiovasculares antagônicos aos já conhecidos para o eixo clássico: ECA/Ang II/AT₁ (Santos *et al.*, 1988; Donoghue *et al.*, 2000; Jankowski *et al.*, 2007).

A ativação do eixo clássico ECA/Ang II/AT₁ exerce um papel importante na fisiopatologia cardíaca. Os mecanismos de sinalização da Ang II e seus receptores são bem conhecidos e a ativação do receptor AT₁ causa alterações no coração, associadas ao crescimento, remodelamento e à função (de Mello *et al.*, 2000). No coração, a Ang II promove a deposição de componentes da MEC, efeito cronotrópico positivo, arritmogênico e hipertrófico. Muitos trabalhos têm demonstrado esses efeitos através de diferentes modelos experimentais. A administração de Ang II em células embrionárias de ratos, por exemplo, promove hipertrofia dos miócitos cardíacos, enquanto o bloqueio do receptor AT₁ pelo losartan atenua esse processo (Price *et al.*, 1997). Outros estudos mostraram que a hiperatividade do eixo ECA/Ang II/AT₁ está relacionada a doenças cardíacas, como a hipertensão arterial, fibrose e remodelamento, culminando na insuficiência cardíaca (Wright *et al.*, 2008; Kuang *et al.*, 2013). A Ang II também exerce efeitos cardiovasculares ao interagir com o receptor AT₂. Esse receptor é bastante expresso durante o desenvolvimento do organismo no período fetal, entretanto após o nascimento é menos presente, surgindo normalmente em condições patológicas. A Ang II interage com o receptor AT₂ e exerce efeitos que normalmente contrabalanceiam as ações mediadas pelo AT₁, incluindo efeitos antiproliferativos, antifibróticos, anti-hipertróficos, vasodilatadores, cronotrópicos negativos e pró-apoptóticos em células do músculo liso vascular (Tsutsumi *et al.*, 1999; Nouet *et al.*, 2000; Suzuki *et al.*, 2002; Jones *et al.*, 2008).

Desde a sua descoberta há aproximadamente três décadas, inúmeros trabalhos avaliam os efeitos da Ang-(1-7) no tecido cardíaco, em diferentes modelos. Patel *et al.* demonstraram que a administração de Ang-(1-7) em camundongos com insuficiência cardíaca, induzida por sobrecarga de pressão, reduz a NADPH oxidase, a hipertrofia cardíaca e melhora a disfunção sistólica (Patel *et al.*, 2016). Outro estudo demonstrou que a Ang-(1-7) reduz o remodelamento cardíaco ao diminuir a fibrose intersticial e perivascular, a síntese de colágeno e outras proteínas pelos fibroblastos (McCollum *et al.*, 2012). Além disso, a infusão crônica da Ang-(1-7) previne a insuficiência cardíaca (Averill *et al.*, 2003) e o tratamento desse peptídeo incluído em HP β CD melhora a função cardiovascular, ambos induzidos pelo infarto agudo do miocárdio (Marques *et al.*, 2012).

Componente importante do SRA, a alamandina é um peptídeo pertencente ao eixo contra-regulatório, que possui ações semelhantes a Ang-(1-7). Embora tenha sido caracterizada recentemente, um crescente número de trabalhos tem mostrado um papel importante desse peptídeo na regulação do remodelamento cardíaco em diferentes modelos experimentais. Lautner *et al.* demonstraram que uma dose de 50 μ g/kg de alamandina incluída em HP β CD por dia é capaz de reduzir a deposição de colágeno I, III e fibronectina, induzida por isoproterenol no coração de ratos (Lautner *et al.*, 2013). Mais recente, de Jesus *et al.* mostraram uma ação anti-hipertrófica da alamandina em cultura de cardiomiócitos de ratos neonatos. Nesse estudo os autores administraram 100nm/L de Ang II por 36 horas e observaram um crescimento celular de 33% e um aumento na expressão de β -MHC, enquanto o grupo incubado simultaneamente com alamandina não apresentou hipertrofia e nem aumento nos níveis da β -MHC (de Jesus *et al.*, 2018). Outro estudo recente feito por Li *et al.*, avaliou o papel da amandina na apoptose, inflamação e disfunção cardíaca induzida em um modelo de sepse. Nesse estudo os autores demonstraram que a alamandina aumenta as frações de ejeção e encurtamento reduzidas pelo LPS aplicado no peritônio, reduz os processos inflamatórios e impede a autofagia e apoptose e reduz os níveis de moléculas associadas ao remodelamento cardíaco, como às pertencentes a via das MAPK (Li *et al.*, 2018). Considerando esses resultados, a hipótese do presente trabalho é que a administração oral de alamandina seja capaz de reduzir os parâmetros associados ao remodelamento cardíaco *in vivo*, induzidos por sobrecarga de pressão.

2. Objetivos

2.1 Objetivo geral

Avaliar os efeitos da administração oral de alamandina no remodelamento cardíaco, desenvolvido em resposta à sobrecarga pressórica gerada pela cirurgia de TAC, em camundongos C57BL/6J.

2.2 Objetivos específicos

- I.** Analisar a função cardíaca através do exame ecocardiográfico, 14 dias após a realização da TAC;
- II.** Avaliar os efeitos da administração oral de alamandina nas alterações morfológicas do ventrículo esquerdo (VE) após a realização da TAC;
- III.** Investigar o resultado do tratamento com alamandina na deposição de colágeno total e perivascular no VE;
- IV.** Analisar os efeitos da alamandina na expressão de marcadores conhecidos da função, proliferação, crescimento e remodelamento do tecido cardíaco e da matriz extracelular, como: SERCA2, PLN, TGF- β , ERK1/2 e MMP-2;
- V.** Investigar se a administração oral de alamandina é capaz de prevenir a produção de EROs induzidas pela TAC;

3. Metodologia

3.1 Animais

Para esse estudo foram utilizados camundongos da linhagem C57BL/6J machos selvagens (*wild-type*) com idade entre 10 e 12 semanas e média de peso de 23g. Esses animais foram obtidos do Centro de Bioterismo do ICB/UFMG (CEBIO) e mantidos no Biotério de Camundongos do Departamento de Fisiologia e Biofísica da UFMG, sob condições controladas de temperatura (22° C) e com ciclo claro-escuro de 12 horas de luz e 12 horas de escuro. A ração (Labina) e a água filtrada foram oferecidas *ad libitum*.

Todos os protocolos utilizados foram submetidos e aprovados pelo Comitê de Ética e Pesquisa no Uso de Animais (CEUA) da Pró-reitora de Pesquisa e Pós-graduação da Universidade Federal de Minas Gerais (349/2016).

Os animais foram divididos aleatoriamente em 3 grupos experimentais, discriminado na tabela 1.

Tabela 1. Grupos experimentais.

GRUPO	PROCEDIMENTO
SHAM	Animais falsamente operados, submetidos ao procedimento cirúrgico com exceção da TAC e tratados por gavagem com o veículo de administração do peptídeo.
TAC	Animais submetidos à TAC e tratados por via oral através de gavagem com o veículo de administração da alamandina.
TAC + ALA	Animais submetidos ao procedimento cirúrgico, coarctados e submetidos à administração de alamandina por via oral (gavagem).

A figura 5 ilustra os procedimentos experimentais e o fluxograma de tempo. Ao final do período de tratamento os animais foram escolhidos ao acaso, submetidos ao exame ecocardiográfico e eutanasiados para a coleta dos tecidos.

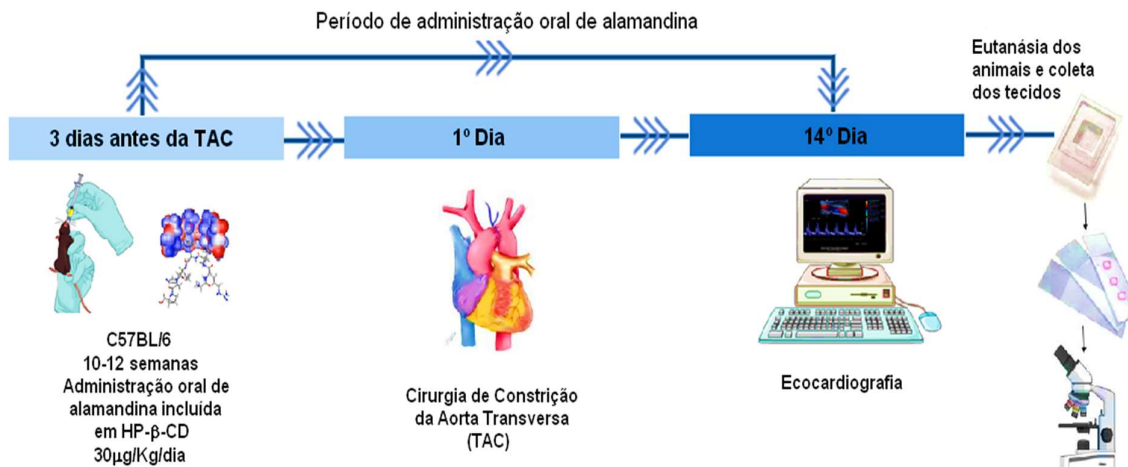


Figura 5: Fluxograma de tempo. Três dias antes da realização da TAC iniciou-se a administração oral de alamandina incluída em HP β CD, na dose de 30 μ g/kg/dia. Essa aplicação permaneceu até o 14º dia após a cirurgia.

3.2 Constrição da aorta transversa

Para a realização da cirurgia os animais foram anestesiados com uma solução contendo 150mg/kg de ketamina (2,5%) e 12mg/kg xilazina (0,2%) diluídas em salina estéril. Após confirmação da anestesia, os animais foram posicionados em decúbito dorsal e submetidos a tricotomia na região anterior do tórax utilizando-se uma lâmina.

Com o animal em posição supina, uma fita de borracha é posicionada sobre os dentes da frente para a extensão do pescoço e a língua é delicadamente manipulada para a intubação endotraqueal. Os animais foram mantidos sob ventilação mecânica do tipo ventilação controlada por volume (VCV) com volume corrente de 0,5ml de ar ambiente e frequência respiratória de 110 ipm. A mobilidade torácica e o ritmo respiratório do animal foram utilizados para verificar o sucesso da intubação (de Almeida, 2010).

O acesso ao interior da cavidade torácica se deu através de uma incisão a nível do segundo espaço intercostal esquerdo superior. O timo e o tecido adiposo foram cuidadosamente separados dos vasos da base. A aorta transversa, que está localizada entre a artéria inominada e a carótida esquerda foi então exposta e um fio de sutura [7.0 TI-CRON] foi colocado em torno da mesma, sendo posicionada externamente e perpendicular ao vaso, uma agulha de calibre 27G, para determinar o grau de constrição promovido pelo fio ao ser dado um nó duplo (figura 6). Em seguida

a agulha é retirada e o tórax fechado e suturado. Os animais do grupo SHAM são submetidos aos mesmos procedimentos descritos, exceto pela constrição da aorta transversa. Após o procedimento cirúrgico, os animais foram acondicionados para recuperação e mantidos por 30 minutos em oxigênio medicinal (2mL/min).

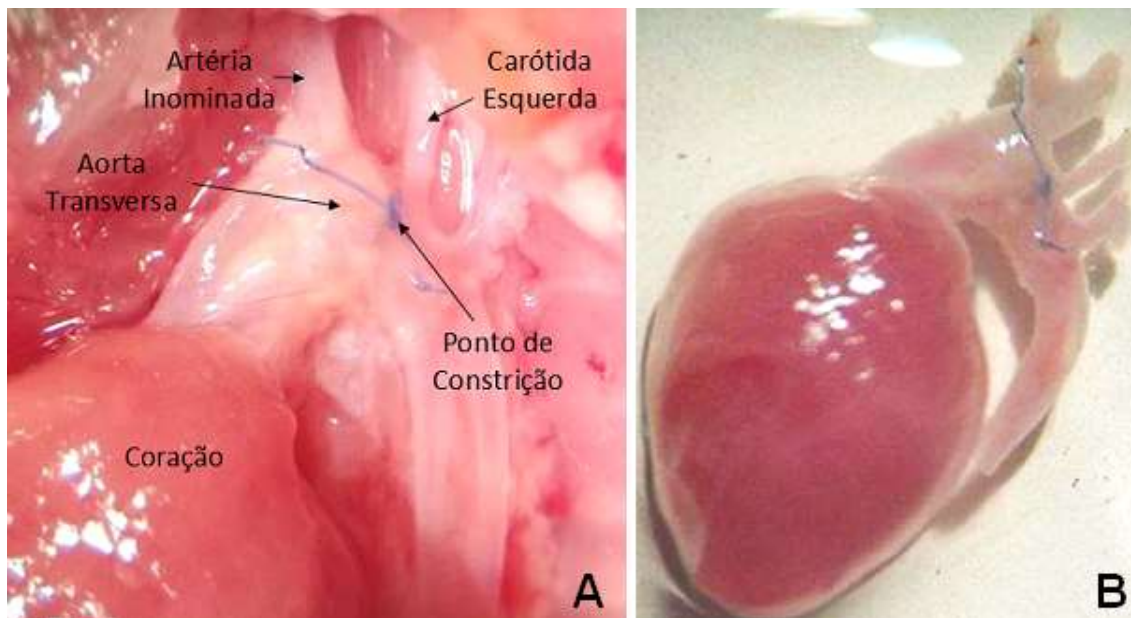


Figura 6: Representação do coração e arco aórtico durante o processo de isolamento. (A) Após a toracotomia o timo e tecido adiposo foram removidos para facilitar a visualização do ponto de constrição. **(B)** Ao final dos 14 dias, o tecido adiposo foi retirado, o coração e os vasos da base foram removidos e transferidos para uma placa de vidro contendo solução salina.

3.3 Administração oral de alamandina

Três dias antes da realização da TAC iniciou-se a administração oral (gavagem) de alamandina incluída em HP β CD [(2-Hidroxipropil) - β -ciclodextrina], na dose de 30 μ g/kg/dia. Essa aplicação permaneceu até o 14^o dia após a cirurgia (Figura 5). A diluição do complexo alamandina-HP β CD foi calculada de forma que cada animal recebesse um volume máximo de 1,5mL de solução por dia. A dose de alamandina utilizada foi baseada em dados prévios padronizados pelo nosso grupo.

3.4 Ecocardiograma

Para a realização do ecocardiograma, os camundongos foram anestesiados com isoflurano 5% durante 1 minuto com auxílio de uma câmara de inalação e mantidos anestesiados na dose de 1,25% de isoflurano durante o registro. Após acondicionamento dos animais em uma placa aquecida para manutenção da temperatura corporal (37°), a região anterior do tórax foi submetida à tricotomia com creme depilatório próprio.

Para obtenção dos dados, foi utilizado um sistema ecodopplercardiográfico de alta frequência e alta resolução, que consiste em uma máquina de ultrassom VEVO 2100 equipado com um transdutor de 30-40 MHz bifrequencial (Visual Sonics, Toronto, Canadá). Os registros e imagens foram exportados para o software Sante DICOM Editor (SanteSodt LTD, Athens Greece) para análises posteriores.

3.5 Eutanásia

Para a coleta dos tecidos, os animais foram anestesiados com solução de ketamina (2,5%) e xilazina (0,2%) na dose de 150mg/kg e 12mg/kg respectivamente e submetidos à abertura do tórax. Em seguida, com o auxílio de uma seringa com a agulha posicionada no VE, foram infundidos 10mL de solução salina, seguida por infusão de 10mL de solução de KCl 10% (cloreto de potássio), para induzir a parada do coração em diástole. O tecido adiposo foi delicadamente retirado e o coração, juntamente com os vasos da base, foram coletados e transferidos para uma placa de vidro contendo solução salina, posicionada sobre outra placa contendo gelo (figura 6B). O coração foi cuidadosamente separado dos vasos da base e o VE, juntamente com o septo interventricular foi separado das demais câmaras do coração. O VE isolado foi então dividido transversalmente em duas partes. A porção mais próxima à base foi congelada no nitrogênio líquido e destinada à biologia molecular, enquanto a porção mais apical foi posicionada em criomoldes embebidos em O.C.T – *Optimal Cutting Temperature* (Tissue Tek) e congelada à -20°C para as análises histológicas.

3.6 Análises histomorfométricas

Para as análises histológicas, foram feitos cortes transversais de 8 μ m de espessura do ventrículo esquerdo com auxílio de um criostato (Leica CM1950), em temperaturas de -20°C, começando sempre do ápice do ventrículo. Esses cortes foram colocados sequencialmente em lâminas previamente gelatinizadas, de maneira que ao final da última lâmina, foram desprezados 100 μ m de tecido, para então, iniciar-se novamente a sequência a partir da primeira lâmina, totalizando 6 cortes por lâmina.

As lâminas foram coradas com Hematoxilina e Eosina (HE) seguindo o protocolo padrão. Para a análise morfométrica, as imagens dos cortes transversais foram obtidas com uma câmera conectada a um microscópio de luz em ampliações de 40X. Foram registradas 40 fotos distribuídas aleatoriamente entre os cortes nas lâminas. Utilizando o programa ImageJ, foram selecionadas 100 células para análise, dentro das 40 imagens registradas. Para analisar o diâmetro das células, apenas os cardiomiócitos em cortes transversais com os núcleos e os limites celulares visíveis foram selecionados para análise.

3.7 Avaliação da deposição de colágeno total e perivascular

Para análise da deposição total de colágeno, foi utilizada a coloração do tricrômico de Masson. Seguindo o protocolo padrão, as lâminas contendo os cortes transversais foram inicialmente hidratadas durante 5 minutos. Em seguida, foram mergulhadas em solução de Bouin e colocadas na estufa em temperatura de 60°C por 60 minutos. Após lavar em água corrente até desaparecer a tonalidade amarelada deixada pela solução de Bouin, as lâminas foram coradas pela solução de Hematoxilina Férrica de Weigert (A e B) por 10 minutos e lavadas em seguida em água corrente por mais 10 minutos. Na etapa seguinte foi utilizada solução Escarlata de Biebrich por 5 minutos e após mergulhar as lâminas em água destilada, foi utilizada a solução de Ácido Fosfotúngstico-Fosfomolibdico durante 10 minutos, para então novamente serem mergulhadas em água destilada. Na etapa seguinte as lâminas são mergulhadas na solução de Ácido Acético Glacial 1% por 5 minutos e lavadas novamente com água destilada. Por fim, foram realizados os protocolos padrões de desidratação com álcoois em diferentes concentrações (álcool absoluto, 95 %, 85 % e 75 %) e xilol. As lâminas foram então seladas com Entellan e esmalte incolor.

Para avaliar a deposição de colágeno, foram adquiridas imagens com auxílio de uma câmera acoplada a um microscópio convencional. Para análise do colágeno total, foram obtidas aleatoriamente 40 fotos em cada lâmina. Já para a análise do colágeno perivascular, foram obtidas 15 fotos contendo vasos, distribuídas entre os 6 cortes da lâmina, também ao acaso. Essas imagens foram quantificadas com auxílio do programa Image ProPlus 6.0. No Tricrômico de Masson o citoplasma e as fibras musculares aparecem em vermelho, enquanto o colágeno é corado em tons de azul ou verde e, portanto, as áreas marcadas em azul foram selecionadas e normalizadas pela área total.

3.8 Identificação de proteínas e western blot

A porção do VE destinada à biologia molecular foi homogeneizada utilizando-se um homogeneizador de tecidos PRO Scientific 200, 4 vezes durante 10 minutos, totalizando 40 minutos, em solução tampão para a extração de proteína total, contendo tampão de lise (100mM NaCl, 50mM Tris-base, 5mM EDTA-2Na, 50mM Na₄P₂O₇.10H₂O, 1mM MgCl₂, pH=8,0), detergentes (Nonidet P40 1%, Triton x-100 0,3% e Deoxicolato de sódio 0,5%) e inibidores de proteases e fosfatases (PMSF 200mM, benzamidina 1mM, pepstatina 5µM, aprotinina 1,5 µM; 20mM NaF e 1mM Na₃VO₄). Na etapa seguinte o homogenato foi centrifugado por 20 minutos, a 4°C à 10.000 rpm, retirando-se posteriormente o sobrenadante. As proteínas presentes no sobrenadante foram quantificadas pelo método de Bradford (Bradford, 1976).

Após determinada a quantidade de proteínas presentes em cada amostra, 60µg foram diluídas em tampão de amostra 5X (2M Tris pH=6.8, 20% Glicerol, 30% SDS, 25% β-mercaptoetanol, 0,1% Azul de Bromofenol) e água, totalizando 12µL de solução, que foram desnaturadas à 95°C durante 5 minutos e aplicadas no gel *SDS-PAGE* 10% (*sodium dodecyl (lauryl) sulfate-poliacrilamide gel electroforesis*). Um marcador de peso molecular (*Kaleidoscope*, pré-corado, Bio-Rad, EUA) foi aplicado em uma das canaletas no gel. Após a separação das proteínas, elas foram transferidas para uma membrana de PVDF (fluoreto de polivinilideno) ativada em metanol. Concluída a transferência, a membrana foi lavada com solução TBS contendo 0,05% de *Tween* 20 (TBS-T) e mergulhada em solução de bloqueio (leite 5% em TBS-T) por 1 hora no agitador, para evitar ligações inespecíficas e

posteriormente incubada *overnight* a 4°C com o anticorpo primário específico para a proteína de interesse. Na etapa seguinte a membrada é deixada, ainda com o anticorpo primário, em temperatura ambiente no agitador por 20 minutos, para em seguida ser lavada com TBS-T por mais 30 minutos (o TBS-T é trocado a cada 10 minutos). A próxima fase consistiu em incubar a membrana com o anticorpo secundário, observando-se a especificidade do primário, por 1 hora à temperatura ambiente no agitador. Passado esse tempo, a membrana é novamente lavada por mais 30 minutos com TBS-T e revelada por quimioluminescência (ECL plus – Amersham Biotechnology) e a intensidade avaliada por análise densitométrica com auxílio do fotodocumentador *ImageQuant LAS 4000 Series* (GE Healthcare Life Sciences).

Foram avaliadas a expressão e fosforilação de marcadores conhecidos da função, proliferação, crescimento e remodelamento do tecido cardíaco e da matriz extracelular, como: SERCA2, TGF- β , MMP-2 (normalizados pelos níveis de expressão de GAPDH) e PLN (thr17), ERK1/2 (normalizados pelos níveis totais de proteínas).

3.9 Ensaio de imunofluorescência

Para o ensaio de imunofluorescência, as lâminas foram fixadas com acetona gelada por 15 minutos e lavadas com solução de BSA 1%. Em seguida, elas foram bloqueadas com solução de BSA 3% diluído em PBS 1X com 0,1 % de Triton-X durante 30 minutos. Na etapa seguinte, após serem novamente lavadas com BSA 1%, as lâminas foram incubadas, em câmara úmida à 4°C *overnight*, com o anticorpo primário anti-MMP-2 (1:450) diluído na solução de bloqueio. Na próxima etapa, as lâminas foram lavadas, e incubadas com o anticorpo secundário (1:200) durante 1 hora à 37°C. Por fim, foi utilizado o DAPI (Vector *Laboratories*) para marcação dos núcleos. As lâminas foram seladas com esmalte incolor e as imagens foram capturadas com o uso do microscópio APOTOME.

3.10 Mensuração das espécies reativas de oxigênio

Para avaliar a produção de EROs nos cortes transversais de VE, foi utilizado o corante fluorescente oxidativo dihidroetídio (DHE) (Lee, 2012). Seguindo o protocolo padrão, as lâminas receberam inicialmente PBS 1X durante 10 minutos na estufa a 37° C. Em seguida elas foram incubadas com o DHE (10 μ M) em câmara escura e úmida novamente à 37° C, durante 30 minutos. As lâminas de controle negativo receberam a mesma quantidade de tampão, mas sem o DHE. Após esse período, as imagens foram capturadas com o uso do microscópio APOTOME, equipado com filtro no comprimento de onda de 545nm, usando a objetiva de 40X. Foram tiradas 20 fotos, escolhidas aleatoriamente entre os 6 cortes em cada lâmina. A densidade integrada da fluorescência emitida pelos produtos da oxidação do DHE em uma determinada área foi quantificada através do programa ImageJ.

3.11 Análise estatística

Os dados foram expressos como a média dos valores analisados \pm erro padrão da média (E.P.M.). Foi realizado teste de normalidade e as diferenças estatísticas entre os grupos foram analisadas pelo teste ANOVA, seguido pelo pós-teste Newman-Keuls. Diferenças foram consideradas estatisticamente significantes quando $p < 0,05$. As análises foram realizadas com auxílio do programa GraphPrism.

4. Resultados

4.1 Alterações hemodinâmicas no arco aórtico 14 dias após a TAC

Após o décimo quarto dia após a TAC, realizamos o Eco-Dopplercardiograma para avaliar *in vivo* a eficácia da constrição. Com esse objetivo, analisamos o grau de constrição provocado pela cirurgia nos grupos operados, bem como o gradiente médio de pressão no arco aórtico. Como pode ser observado na figura 7 a constrição provocada pela cirurgia nos animais do grupo TAC e TAC+ALA, promoveu uma redução no diâmetro aórtico de aproximadamente 66%, quando comparados ao grupo controle (SHAM $1,21 \pm 0,04$ vs TAC $0,41 \pm 0,04$ vs TAC+ALA $0,39 \pm 0,03$ mm). Essa redução no diâmetro causou uma elevação do gradiente médio de pressão no grupo TAC, quando comparado ao controle (SHAM $0,71 \pm 0,08$ vs TAC $12,90 \pm 0,73$ mmHg). Já no grupo tratado com alamandina, foi observada uma redução do gradiente médio de pressão, quando comparado ao grupo não tratado (TAC $12,90 \pm 0,73$ vs TAC+ALA $9,71 \pm 1,16$ mmHg), embora seja importante destacar que o grupo TAC+ALA manteve a elevação do gradiente médio de pressão em relação ao grupo controle (SHAM $0,71 \pm 0,08$ vs TAC+ALA $9,71 \pm 1,16$ mmHg) (figura 8).

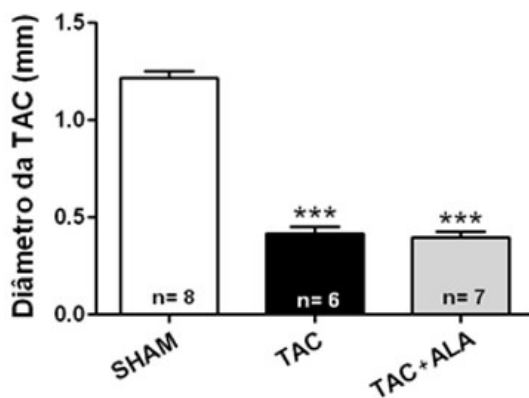


Figura 7: Redução no diâmetro da aorta transversa após a TAC. Após a realização da TAC houve uma redução no diâmetro da aorta de 66%. Os valores representam a média \pm EPM. *** $p < 0,0001$ em relação ao grupo SHAM. n = número de animais

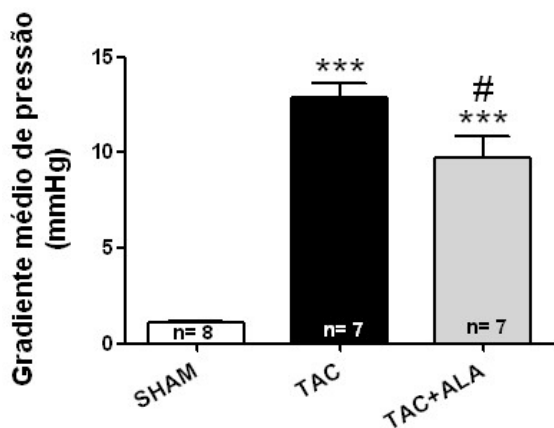


Figura 8: Gradiente de pressão aórtico. A redução no diâmetro causado pela TAC provocou uma elevação do gradiente médio de pressão nos grupos TAC e TAC+ALA. Os valores representam a média \pm EPM. *** $p < 0,0001$ em relação ao grupo SHAM # $p < 0,05$ em relação ao grupo TAC. n = número de animais.

Ainda nesse contexto, utilizando o Doppler colorido, observamos que a TAC provocou uma alteração no padrão do fluxo sanguíneo em relação ao grupo SHAM. O fluxo laminar, caracterizado pelo predomínio da cor azul e presente no grupo SHAM (figura 9A), tornou-se turbilhonar em decorrência da redução no diâmetro aórtico após a TAC, evidenciado pela presença predominante das cores vermelho e amarelo na figura 9B.

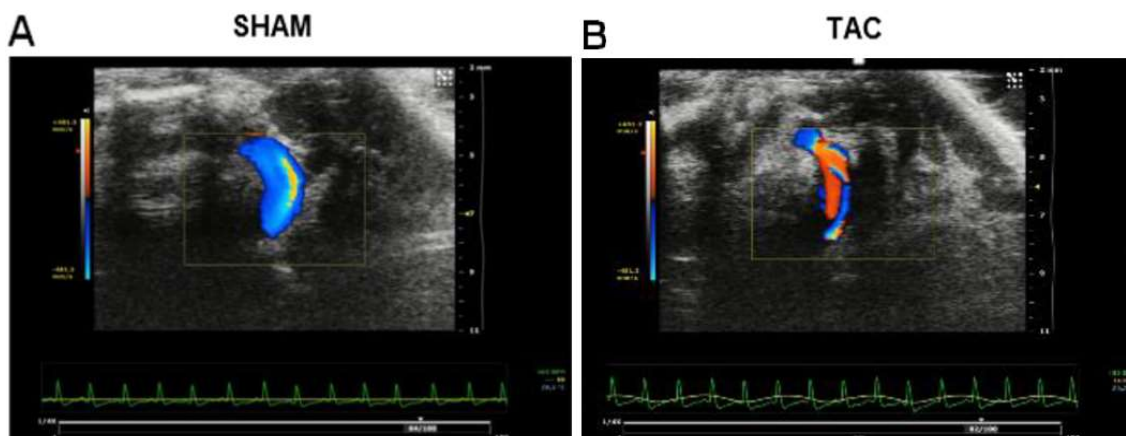


Figura 9: Representação qualitativa das alterações hemodinâmicas no arco aórtico provocadas pela TAC. Utilizando o Doppler colorido foi possível observar que a TAC provocou alterações no padrão laminar do fluxo sanguíneo no grupo SHAM, evidenciado pelo predomínio da cor azul (A), para um fluxo turbilhonar, caracterizado pela variação entre as cores laranja, vermelho e amarelo no grupo TAC (B).

4.2 Efeitos da administração oral de alamandina nos parâmetros morfológicos e funcionais cardíacos 14 dias após a TAC

Os parâmetros morfológicos e funcionais cardíacos analisados pelo ecocardiograma estão listados na tabela 2. Os resultados desse exame demonstraram que após duas semanas de TAC não ocorreram alterações nos parâmetros funcionais analisados. Nos parâmetros morfológicos, os grupos TAC e TAC+ALA apresentaram aumento significativo na espessura da parede posterior do VE em sístole, quando comparados ao grupo controle (SHAM $0,79 \pm 0,03$ vs TAC $0,92 \pm 0,03$ vs TAC+ALA $0,95 \pm 0,06$ mm). De maneira intrigante, o grupo TAC+ALA apresentou aumento na espessura da parede posterior do VE em diástole, quando comparado ao controle (SHAM $0,62 \pm 0,02$ vs TAC+ALA $0,78 \pm 0,06$ mm), assim como a espessura do septo interventricular em diástole, que mostrou um espessamento, também em relação ao controle (SHAM $0,62 \pm 0,03$ vs TAC+ALA $0,77 \pm 0,03$ mm). Como pode ser observado na tabela 2, os demais parâmetros não apresentaram diferença estatística entre os grupos experimentais após duas semanas de TAC.

Tabela 2. Parâmetros funcionais e morfológicos cardíacos 14 dias após a TAC.

	SHAM (n=8)	TAC (n=7)	TAC + ALA (n=6)
Fração de encurtamento VE (%)	25,83 ± 2,12	26,53 ± 0,87	27,52 ± 1,81
Fração de ejeção VE (%)	51,13 ± 3,23	52,64 ± 1,32	54,03 ± 2,86
Volume sistólico (µL)	29,62 ± 1,19	31,55 ± 2,20	32,87 ± 4,04
Frequência Cardíaca (bpm)	474,30 ± 17,09	467,90 ± 24,49	474,4 ± 28,15
Débito Cardíaco (mL/min)	13,96 ± 0,36	14,93 ± 1,02	15,66 ± 1,63
Massa do VE (mg)	83,23 ± 4,77	92,26 ± 8,57	106,00 ± 6,24
Volume diastólico final (µL)	59,46 ± 3,99	59,63 ± 2,94	61,71 ± 7,49
Volume sistólico final (µL)	29,84 ± 3,24	28,08 ± 1,03	28,84 ± 3,95
Espessura do septo interventricular- diástole (mm)	0,63 ± 0,04	0,70 ± 0,03	0,78 ± 0,03*
Espessura do septo interventricular- sístole (mm)	0,84 ± 0,05	0,84 ± 0,03	0,97 ± 0,06
Espessura da parede posterior VE – diástole (mm)	0,62 ± 0,02	0,67 ± 0,04	0,78 ± 0,07*
Espessura da parede posterior VE- sístole (mm)	0,79 ± 0,03	0,92 ± 0,03*	0,96 ± 0,06*
Diâmetro interno do VE- diástole (mm)	3,79 ± 0,11	3,80 ± 0,07	3,77 ± 0,20
Diâmetro interno do VE- sístole (mm)	2,79 ± 0,14	2,80 ± 0,06	2,73 ± 0,19

Os parâmetros que apresentaram diferença estatística entre os grupos estão destacados na tabela. Os valores representam a média ± EPM. * p<0,05 em relação ao grupo SHAM. n = número de animais.

4.3 A administração oral de alamandina impede a hipertrofia dos cardiomiócitos ventriculares induzida pela TAC

O aumento no trabalho cardíaco provocado pela TAC promove alterações gênicas, celulares e moleculares, que culminam na hipertrofia dos miócitos cardíacos e reduzem o estresse parietal (Rüdebusch *et al.*, 2017). Esse aumento no volume das células está associado à síntese e deposição dos elementos contráteis, assim como alterações na relação entre as isoformas desses componentes (LU *et al.*, 2011).

Para avaliar as alterações celulares provocadas pela TAC, os cortes transversais do VE nos grupos SHAM, TAC e TAC+ALA foram corados com HE. A análise das células, com os núcleos e limites celulares visíveis, mostrou que a TAC por duas semanas, promoveu a hipertrofia dos cardiomiócitos, evidenciado pelo aumento na área celular (SHAM $247,70 \pm 9,32$ vs TAC $346,30 \pm 23,35 \mu\text{m}^2$). Por outro lado, a administração oral de alamandina impediu a hipertrofia celular no grupo TAC+ALA ($265,9 \pm 8,98 \mu\text{m}^2$) (figuras 10A e B).

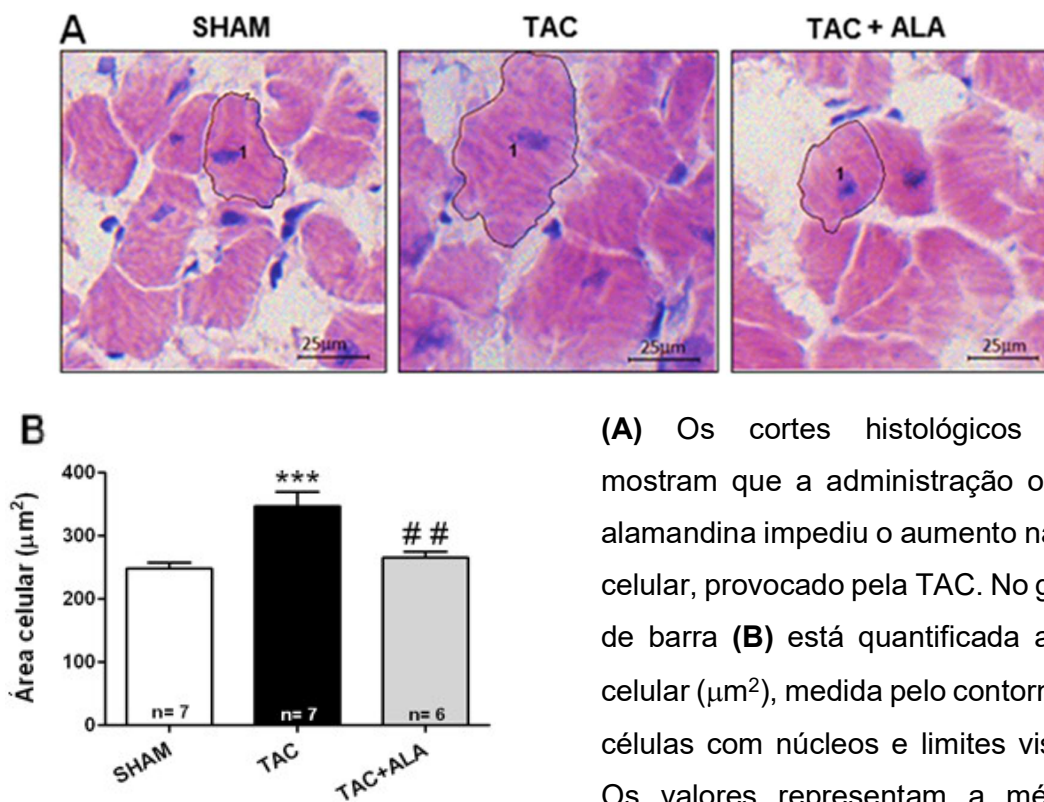


Figura 10: Efeitos da administração oral de alamandina nas alterações morfométricas celulares.

(A) Os cortes histológicos (40x) mostram que a administração oral de alamandina impediu o aumento na área celular, provocado pela TAC. No gráfico de barra (B) está quantificada a área celular (μm^2), medida pelo contorno das células com núcleos e limites visíveis. Os valores representam a média \pm EPM. *** $p < 0,0001$ em relação ao grupo SHAM ## $p < 0,001$ em relação ao grupo TAC. n = número de animais.

Tendo em vista o importante papel das MAPK na transdução de sinais extracelulares para o interior das células e sua relação com as respostas hipertróficas, como o crescimento dos cardiomiócitos e o aumento na expressão de genes fetais (Asrih *et al.*, 2013), avaliamos o nível de fosforilação da ERK1/2, após o estímulo pressórico provocado pela TAC. A ERK1/2 pode ser ativada por diferentes estímulos, incluindo o estiramento das células cardíacas provocado pelo estresse biomecânico (Sugden *et al.*, 1998). Como pode ser observado na figura 11, após duas semanas de TAC houve um aumento nos níveis de fosforilação da ERK1/2 no grupo TAC quando comparado ao grupo controle (SHAM $1,02 \pm 0,01$ vs TAC $1,38 \pm 0,12$ U.A.). Já no grupo TAC+ALA, esse aumento não foi observado, visto que o tratamento oral com alamandina normalizou a fosforilação dessa quinase (TAC+ALA $0,94 \pm 0,17$ U.A.).

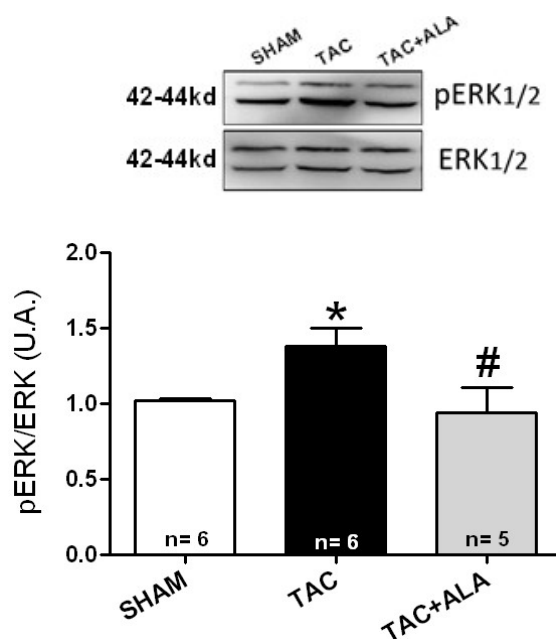


Figura 11: A administração oral de alamandina normaliza a fosforilação da ERK1/2 induzida pela TAC. O painel superior mostra o western blot representativo e o painel inferior mostra o gráfico de barras quantitativo. O tratamento oral com alamandina reduziu os níveis de fosforilação da ERK1/2 observada no grupo TAC. Os valores representam média \pm EPM. * $p < 0,05$ em relação ao grupo SHAM e # $p < 0,05$ em relação ao grupo TAC. n = número de animais.

4.4 A administração oral de alamandina normaliza a deposição de colágeno total e perivascular induzida pela TAC

Para avaliar a extensão da fibrose intersticial e perivascular, duas semanas após a TAC, os cortes transversais do VE foram corados utilizando o tricrômico de Masson. A análise morfológica mostrou um aumento aparente na deposição de colágeno intersticial em resposta à TAC e o tratamento com alamandina impediu o avanço desse processo (figura 12A). A análise quantitativa, pela fração de tecido ocupada pelo colágeno, corrobora a análise morfológica e mostra que há um aumento na deposição de colágeno intersticial no grupo submetido à TAC, quando comparado ao controle (SHAM $11,42 \pm 1,08$ vs TAC $30,25 \pm 1,32$ %). Além disso, o grupo tratado com alamandina não apresentou deposição excessiva de colágeno quando comparado ao grupo TAC (TAC+ALA $14,77 \pm 0,72$ %) (figuras 12A e B). Utilizando a mesma técnica, avaliamos também a deposição de colágeno perivascular e semelhante ao resultado anterior, a TAC promoveu um depósito excessivo de colágeno na parede dos vasos do VE, que foi inibido pela administração oral de alamandina (SHAM $8,51 \pm 0,43$ vs TAC $19,14 \pm 1,18$ vs TAC+ALA $10,57 \pm 1,68$ %) (figura 12A e C).

As alterações na síntese de proteínas da MEC estão associadas à produção local de fatores de crescimento, como o TGF- β . O TGF- β é uma citocina multifuncional, envolvida em vários processos biológicos como proliferação, diferenciação, crescimento celular e deposição de componentes da MEC. Considerando, portanto, o papel do TGF- β de promover alterações na síntese e degradação dos componentes da MEC, avaliamos a expressão dessa citocina no tecido cardíaco. A TAC induziu um aumento na expressão do TGF- β quando comparado ao grupo controle (SHAM $1,00 \pm 0,11$ vs TAC $2,87 \pm 0,69$ U.A.). Por outro lado, como mostrado na figura 13, o tratamento com alamandina impediu o aumento na síntese dessa citocina, mantendo os valores próximos ao grupo SHAM (TAC+ALA $1,24 \pm 0,27$ U.A.).

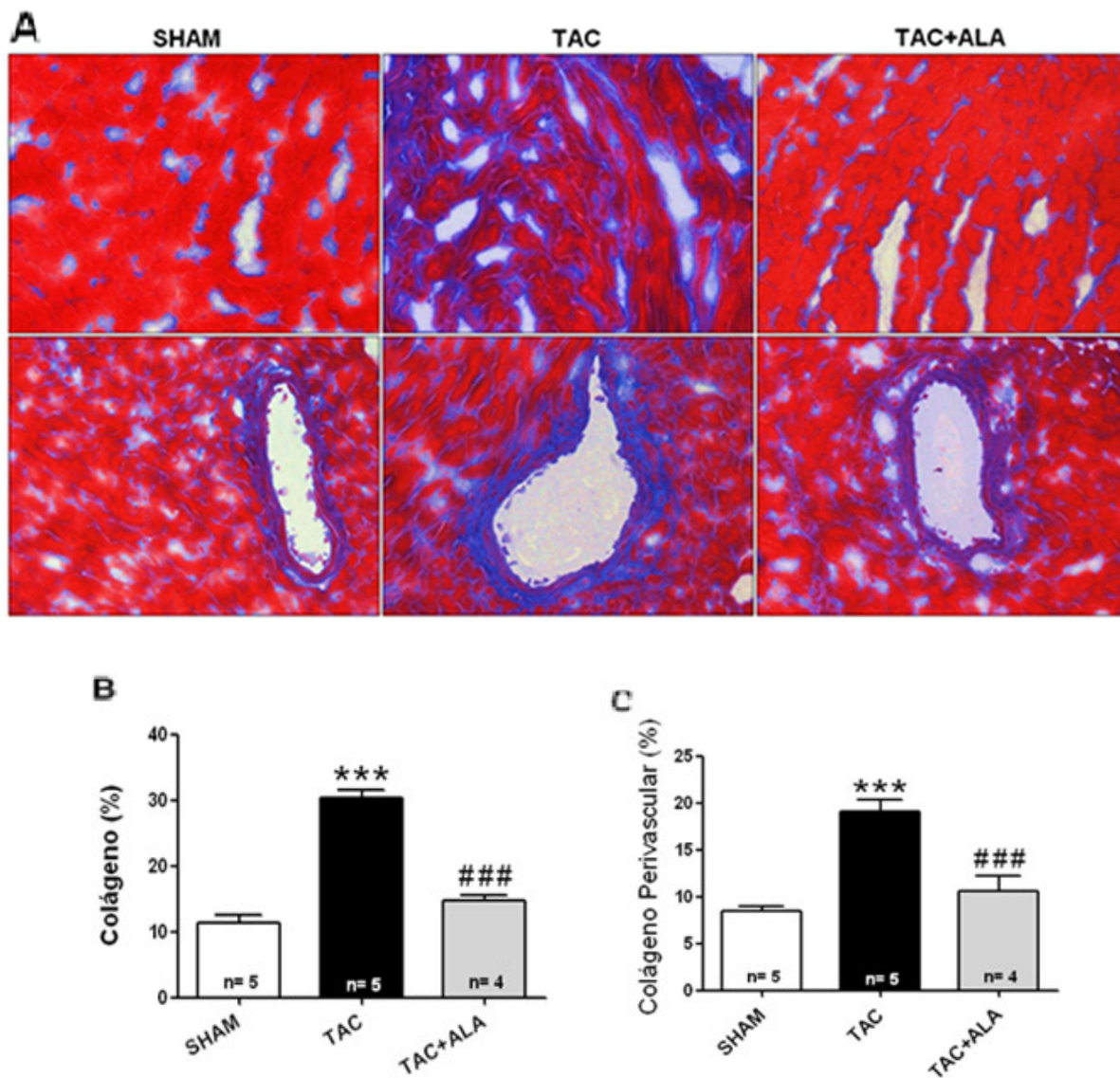


Figura 12: Efeito da administração oral de alamandina no processo fibrótico desenvolvido em resposta à TAC. Imagens representativas (40x) da área total e dos vasos em cortes transversais do VE, corados com tricrômico de Masson e iluminados com luz branca (**A**). Os gráficos de barra (**B**) e (**C**) representam a quantificação do colágeno total e perivascular. Os valores representam média \pm EPM. *** $p < 0,0001$ em relação ao grupo SHAM e ### $p < 0,0001$ em relação ao grupo TAC. n = número de animais.

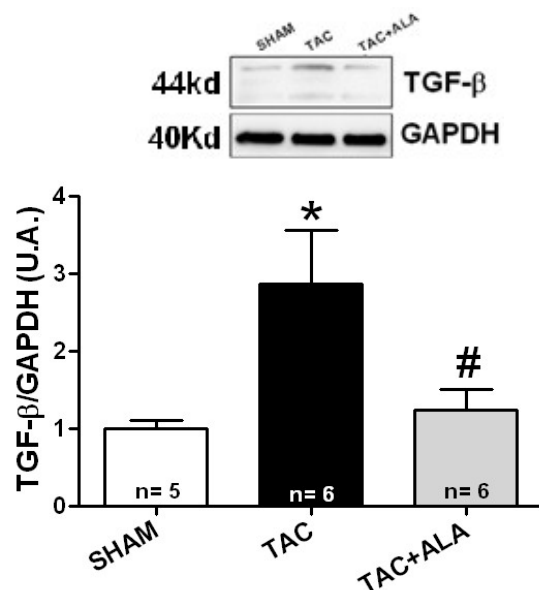


Figura 13: Efeitos da TAC e da administração oral de alamandina na expressão do TGF- β . O painel superior representa as imagens obtidas por western blot. O gráfico de barras mostra a quantificação da expressão do TGF- β após duas semanas de TAC. Os valores representam média \pm EPM. * $p < 0,05$ em relação ao grupo SHAM e # $p < 0,05$ em relação ao grupo TAC. n = número de animais

Ainda no contexto do remodelamento da MEC, avaliamos por western blot, o efeito da TAC e do tratamento com alamandina na expressão da metaloproteinase de matriz (MMP) do tipo 2. Isso porque as MMPs são as principais proteínas responsáveis pela degradação dos componentes da MEC. A MMP-2 desempenha um papel importante no tecido cardíaco e atua sobre diversos substratos, como colágeno do tipo I, II e III, elastina e outros. A análise desses resultados reforça os anteriores, pois foi observado que a TAC induz o aumento na expressão da MMP-2 no VE em relação ao grupo controle (SHAM $1,00 \pm 0,09$ vs TAC $1,93 \pm 0,32$ U.A.). De maneira interessante, a administração de alamandina reduziu a expressão da MMP-2 (TAC+ALA $0,95 \pm 0,19$ U.A.) (figura 14). Esses resultados estão de acordo com as imagens observadas no painel A da figura 14, em que avaliamos qualitativamente, através do ensaio de imunofluorescência, a presença da MMP-2 no tecido ventricular nos três grupos.

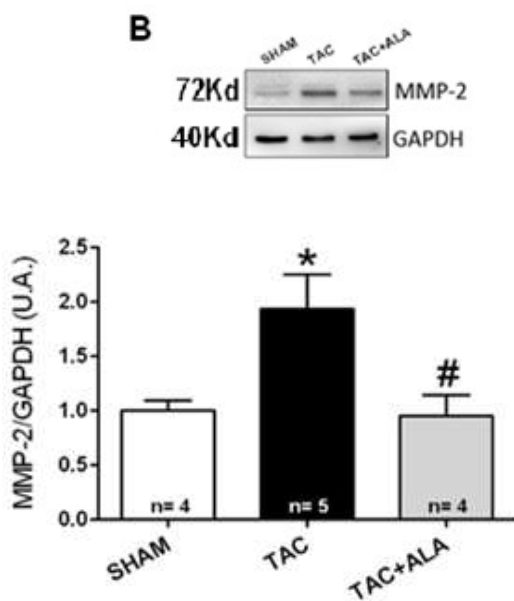
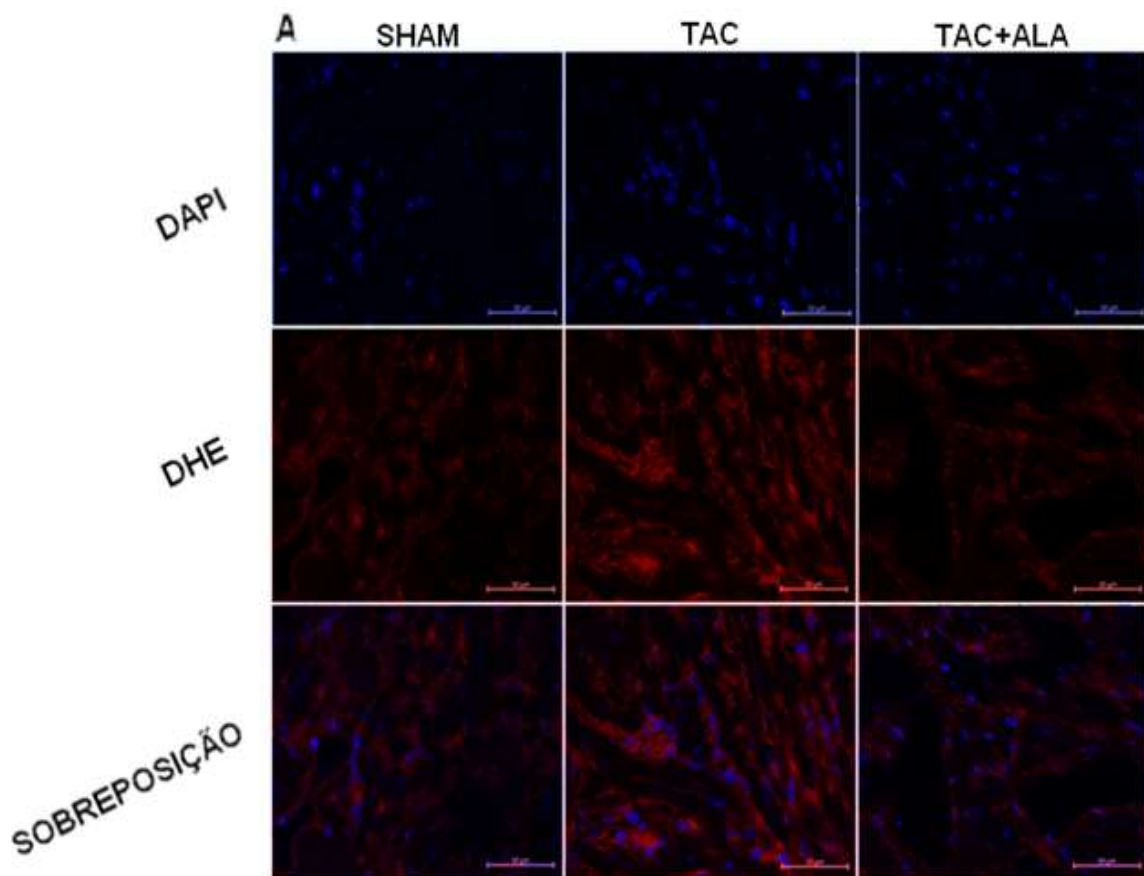


Figura 14: A administração oral de alamandina impede o aumento na expressão da MMP-2 provocada pela TAC. O painel (A) mostra imagens representativas da presença de MMP-2 no VE. O gráfico de barra (B) mostra a imagem representativa do western blot e a análise quantitativa da expressão da MMP-2. Os valores representam média \pm EPM. * $p < 0,05$ em relação ao grupo SHAM e # $p < 0,05$ em relação ao grupo TAC. n = número de animais.

4.5 A administração oral de alamandina promove aumento na expressão e fosforilação de SERCA2 e PLN

A função cardíaca depende, entre outros fatores, da recaptção de Ca^{2+} do espaço intracelular para o RS, o que determina o ciclo de contração e relaxamento do coração. O controle dos estoques de Ca^{2+} no RS é feito pela SERCA e está associado, portanto, aos níveis de expressão e atividade dessa bomba de Ca^{2+} . A atividade da SERCA, por sua vez, é controlada pela expressão e fosforilação da PLN, uma proteína de baixo peso molecular presente na parede no RS. Sendo assim, avaliamos por western blot, o efeito do estresse biomecânico causado pela TAC e do tratamento oral com alamandina na expressão e fosforilação desses dois marcadores da função cardíaca.

A análise dos resultados mostrou um aumento na expressão da SERCA2 em resposta a elevação no trabalho cardíaco provocado pela TAC, quando comparamos com o grupo controle (SHAM $0,89 \pm 0,12$ vs TAC $1,38 \pm 0,06$ U.A., $p < 0,05$). É interessante notar que o grupo tratado com alamandina também apresentou um aumento na expressão da SERCA2 em relação ao grupo controle (SHAM $0,89 \pm 0,12$ vs TAC+ALA $1,57 \pm 0,17$ U.A), embora como pode ser observado na figura 15A, a elevação em relação ao controle é mais acentuada, evidenciada pelo valor de $p < 0,01$.

Após duas semanas de TAC também foram avaliados os níveis de fosforilação da PLN no resíduo de aminoácido treonina 17 (Thr17). Nesse período, não foram observadas alterações significativas entre os grupos SHAM e TAC, embora, como mostrado na figura 15B, há uma tendência à redução da fosforilação. Em contrapartida, o tratamento com alamandina aumentou os níveis de fosforilação da PLN(Thr17) em relação aos grupos SHAM e TAC (SHAM $1,19 \pm 0,16$ vs TAC $0,83 \pm 0,10$ vs TAC+ALA $1,62 \pm 0,19$ U.A.). Esses resultados em conjunto sugerem um aumento no desempenho da maquinaria de Ca^{2+} intracelular provocado pela administração oral de alamandina, pois além de promover uma expressão mais acentuada da SERCA2, aumenta sua atividade ao elevar os níveis de fosforilação da PLN(Thr17).

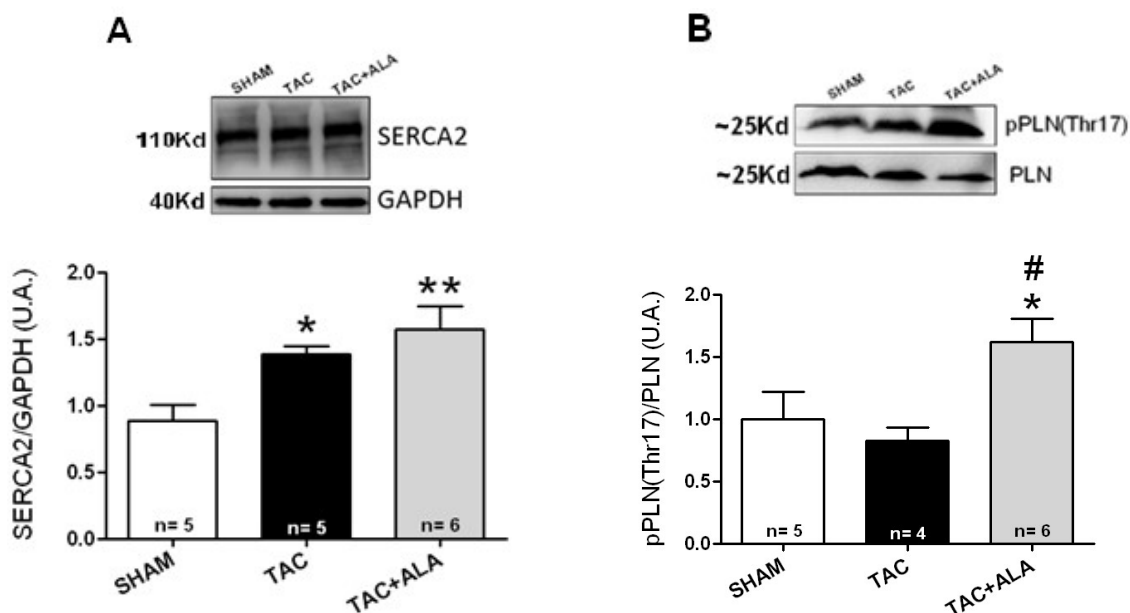


Figura 15: A TAC e a administração oral de alamandina alteram de forma distinta a expressão da SERCA e a fosforilação de PLN entre os diferentes grupos. Os painéis (A) e (B) mostram o western blot representativo. Nos gráficos de barra inferiores estão a expressão proteica da SERCA2 e os níveis de fosforilação da PLN no VE de camundongos. Os valores são mostrados como a média \pm EPM. * $p < 0,05$ e ** $p < 0,01$ em relação ao grupo SHAM e # $p < 0,05$ em relação ao grupo TAC. n = número de animais.

4.6 A administração oral de alamandina reduz a produção de EROs induzida pela TAC

A produção de EROs após a TAC foi avaliada utilizando a sonda fluorescente DHE, que após ser oxidada por EROs se associa ao material genético no núcleo das células e emite fluorescência na cor vermelha. A marcação com o DHE mostrou que a TAC provoca um aumento na produção de EROs no VE quando comparado ao controle (SHAM $24,76 \pm 2,16$ vs TAC $33,70 \pm 1,15$ U.A.), enquanto a administração oral de alamandina impediu a produção dessas espécies (TAC+ALA $24,72 \pm 1,87$ U.A.) (figura 17).

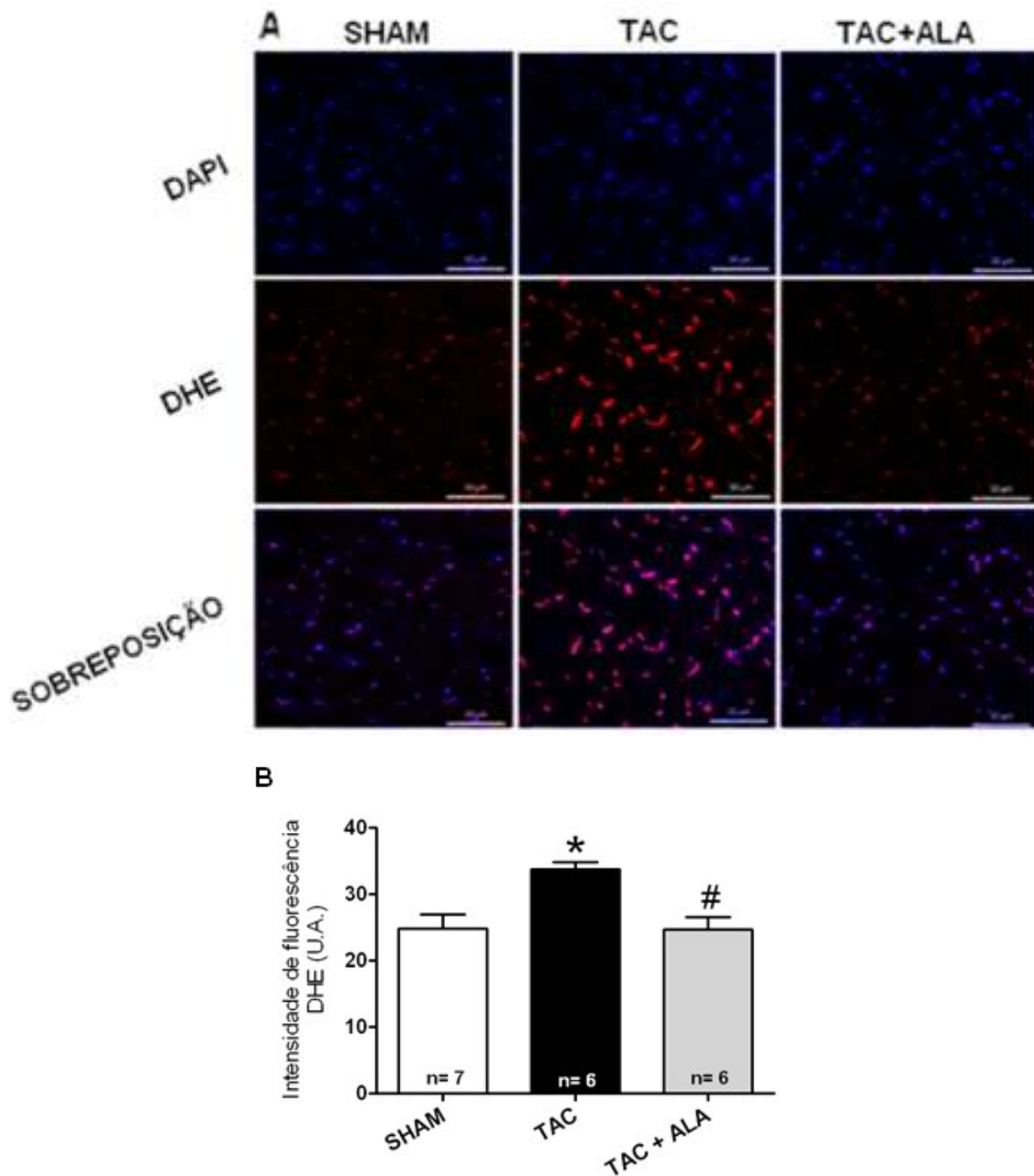


Figura 16: Efeitos da TAC e da administração oral de alamandina na produção EROs no VE. O painel superior traz imagens representativas de cortes transversais corados com DHE. O gráfico de barras mostra a produção de EROs mensurada pela intensidade de fluorescência emitida pelo DHE. Os valores são mostrados como a média \pm EPM. * $p < 0,05$ em relação ao grupo SHAM e # $p < 0,05$ em relação ao grupo TAC. n = número de animais

5. Discussão

Os principais achados desse estudo foi que a alamandina impediu o desenvolvimento da hipertrofia celular, a evolução do processo fibrótico e o aumento na produção de EROs no VE de camundongos, 14 dias após a TAC, que é um modelo experimental comumente utilizado para estudar os efeitos da sobrecarga crônica de pressão no remodelamento cardíaco. Além disso, foi demonstrado que a alamandina diminui a expressão e fosforilação de marcadores clássicos do remodelamento cardíaco induzidos pela TAC. Os resultados sugerem ainda um aumento no desempenho da maquinaria de Ca^{2+} intracelular provocado pelo tratamento com alamandina, pois junto com uma expressão mais acentuada da SERCA2, aumenta os níveis de fosforilação da PLN(Thr17).

A hipertrofia cardíaca é uma resposta adaptativa do coração a estímulos como hipertensão, infarto, arritmias, sobrecarga mecânica, além de desordens endócrinas e gênicas (Molkentin *et al.*, 1998). Esse aumento no tamanho das células gera um espessamento na parede do VE e evidencia a capacidade intrínseca do coração de responder à elevação na pós-carga, e assim, reduzir o estresse parietal de acordo com a lei de Laplace (Lips *et al.*, 2002).

No presente estudo, os resultados ecocardiográficos demonstraram que o grupo submetido à TAC por 14 dias apresentou elevação no gradiente médio de pressão e alteração no padrão laminar do fluxo sanguíneo para um fluxo turbulento na aorta torácica, efeitos característicos da TAC (Rockman *et al.*, 1991). Além disso, o estresse biomecânico provocado pela elevação da pós-carga, induziu o aumento na área transversal total dos cardiomiócitos. Esse resultado é semelhante ao estudo publicado por Nakamura *et al.*, em que a TAC promoveu a hipertrofia do VE a partir do 10º dia de constrição (Nakamura *et al.*, 2001). Rüdibusch *et al.* demonstraram que após 14 dias de TAC há um espessamento na parede do VE quando comparado aos animais controle (Rüdibusch *et al.*, 2017). A novidade do nosso estudo foi que a administração oral de alamandina preveniu o aumento na área dos miócitos cardíacos, quando comparados aos animais do grupo TAC. A ação anti-hipertrófica da alamandina foi demonstrada recentemente por de Jesus *et al.* em cultura de cardiomiócitos de ratos neonatos. O tratamento dessas células com 100nm/L de Ang II por 36 horas provocou aumento de aproximadamente 33% na área celular e elevação nos níveis de mRNA para a β -MHC, enquanto a incubação simultânea com

alamandina (100nm/L por 36 horas) preveniu o aumento no tamanho dos cardiomiócitos e a elevação nos níveis de mRNA para β -MHC. Nesse mesmo estudo os autores demonstraram por qPCR a presença do MrgD nessas mesmas células e em cardiomiócitos proveniente de camundongos adultos (de Jesus *et al.*, 2018). É válido destacar que embora a hipertrofia cardíaca seja uma resposta compensatória, a manutenção do crescimento celular provoca arritmias, insuficiência cardíaca e morte súbita, evidenciando, portanto, a importância da ação anti-hipertrofica observada (Li *et al.*, 2009).

É importante salientar que o aumento na área transversal total das células não resultou em aumento na espessura da parede ventricular no grupo TAC. Os resultados encontrados na análise ecocardiográfica e sumarizados na tabela 2 mostraram que a massa ventricular esquerda não apresentou diferença estatística entre os animais SHAM e os do grupo TAC. Os demais parâmetros da geometria cardíaca também não foram diferentes entre os grupos SHAM e TAC no tempo analisado, com exceção do aumento na espessura da parede posterior do VE em sístole. Esses dados estão de acordo com a variabilidade dos resultados ecocardiográficos descritos na literatura, em diferentes tempos e modelos experimentais. Alguns pesquisadores demonstram indícios de alterações na forma do coração com duas semanas de TAC, enquanto em outros estudos essas alterações começam a aparecer a partir da terceira semana (Hamawaki *et al.*, 1998; Arany *et al.*, 2006; Wang *et al.*, 2017). Embora sejam necessários estudos adicionais para elucidar as variações encontradas nos parâmetros morfológicos do coração em modelos de sobrecarga de pressão analisados pelo ecocardiograma, algumas hipóteses podem ser formuladas para explicar essas desconformidades, como as diferentes linhagens de camundongos usadas, a idade dos animais, o grau de constrição da aorta e a sensibilidade do aparelho utilizado para o ecocardiograma são fatores que devem ser explorados para promover melhor compreensão das variações encontradas nos diversos estudos.

De forma intrigante, três parâmetros morfológicos apresentaram resultados inesperados e controversos acerca da hipertrofia cardíaca. Embora o resultado histológico tenha mostrado um aumento na área transversal total dos cardiomiócitos no grupo TAC em relação ao SHAM que não ocorreu no grupo TAC+ALA, esse padrão não foi reproduzido pelo ecocardiograma. Como pode ser observado na tabela 2, a espessura da parede posterior do VE e a espessura do septo interventricular em diástole apresentou um aumento no grupo TAC+ALA em relação aos animais SHAM.

Embora não tenhamos clareza acerca desses resultados, é importante ressaltar que a alamandina foi descoberta e caracterizada há menos de cinco anos e que o presente trabalho avalia pela primeira vez os efeitos desse peptídeo *in vivo*, em um modelo de sobrecarga de pressão. Sendo assim, ainda não existem estudos que sirvam de base para explicar esses resultados e, portanto, trabalhos adicionais são necessários para elucidar os mecanismos de ação da alamandina e, assim, esclarecer esses achados fortuitos.

As MAPK funcionam como reguladores celulares de diferenciação, proliferação, apoptose e de resposta ao estresse. A porção dessa via que termina com a ativação da ERK1/2 regula o crescimento celular e a adaptação do coração a estímulos fisiológicos e patológicos (Purcell *et al.*, 2007). Um crescente número de trabalhos demonstra um papel importante da ERK1/2 na resposta hipertrófica através do crescimento dos cardiomiócitos e do aumento na expressão de genes fetais (Heineke *et al.*, 2006). Takeishi *et al.* demonstraram que a sobrecarga crônica de pressão provoca ativação da via MEK1-ERK1/2 *in vivo*, resultando em hipertrofia cardíaca (Takeishi *et al.*, 2001). Gillespie-Brown *et al.* demonstraram que a expressão de genes fetais (ANP, β -MHC e α -actin), estimulada pela fenilefrina, era inibida quando os cardiomiócitos ventriculares eram transfectados com dominantes negativos para MEK1-ERK. Nesse mesmo estudo os autores demonstraram que essas células apresentavam uma expressão 5 vezes maior de genes fetais ao serem transfectadas com MEK1-ERK constitutivamente ativa (Gillespie-Brown *et al.*, 1995). Nossos resultados demonstraram que a TAC provocou aumento na fosforilação da ERK1/2 em relação ao SHAM. De maneira interessante o tratamento com alamandina impediu o aumento na fosforilação dessa quinase, mantendo os valores semelhantes ao grupo controle.

Nas doenças hipertensivas ou em modelos experimentais de sobrecarga pressórica, a hipertrofia ventricular é acompanhada de fibrose cardíaca, que se caracteriza pela proliferação e alteração fenotípica de fibroblastos e pelo acúmulo patológico de componentes da MEC (Grobe *et al.*, 2006). A deposição excessiva de colágeno e outros elementos provoca a fibrose difusa ou perivascular, que afetam a forma do coração, reduzem complacência ventricular e vascular e prejudicam o acoplamento eletromecânico, culminando em disfunção contrátil, arritmogênese e insuficiência cardíaca (Kong *et al.*, 2014). Zhou *et al.* demonstraram que após 4 semanas de TAC há uma expansão na área ventricular ocupada pelo colágeno,

aumento na deposição de colágeno perivascular e elevação nos níveis de mRNA para colágeno I e III (Zhou *et al.*, 2017). Resultado semelhante foi encontrado por Xia e cols., que demonstraram que a sobrecarga de pressão causada pela TAC provocou aumento na deposição de colágeno nos ventrículos e aumento na deposição perivascular entre o 3º e o 28º dia, com pico no 7º dia (Xia *et al.*, 2009). Corroborando os dados da literatura, nosso estudo demonstrou que a sobrecarga pressórica causada pela TAC resultou em grande acúmulo de colágeno total e perivascular nos animais coarctados em relação ao controle. De maneira notável o tratamento com alamandina reduziu a extensão na deposição de colágeno total no VE, assim como a deposição de colágeno perivascular. Esse efeito importante na redução da deposição de colágeno foi observado por Lautner *et al.* no coração de ratos wistar tratados com isoproterenol, em que a administração oral de alamandina incluída em HP β CD (50 μ g/kg) reduziu a deposição de colágeno I, III e fibronectina, avaliados por imunofluorescência (Lautner *et al.*, 2013).

A hipertrofia e a fibrose cardíaca são caracterizadas pelos níveis elevados de TGF- β na circulação e diferentes trabalhos demonstraram que existe uma correlação positiva entre o remodelamento cardíaco e os níveis séricos de TGF- β (Fedulov *et al.*, 2005; Peterson *et al.*, 2005). Regulado por estímulos neuro-humorais e mecânicos, o TGF- β é uma citocina ubíqua, multifuncional associada ao SRA. Moriguchi *et al.* demonstraram que a administração de Ang II promoveu elevação nos níveis de mRNA para o TGF- β (Moriguchi *et al.*, 1999). Grobe *et al.* mostraram que a Ang-(1-7) reduz os parâmetros associados ao remodelamento cardíaco, concomitante à redução na expressão do TGF- β (Grobe *et al.*, 2007). O remodelamento induzido pela sobrecarga hemodinâmica também tem sido associado a expressão do TGF- β . Xia *et al.* demonstraram um aumento no mRNA das principais isoformas do TGF- β presentes em mamíferos (TGF- β 1, TGF- β 2, e TGF- β 3) após 7 dias de TAC e que esse aumento foi acompanhado pela elevação na deposição de colágeno e outros componentes da MEC no tecido cardíaco (Xia *et al.*, 2009). Resultado semelhante foi encontrado por Villar *et al.* que também mostraram que a TAC induz elevação nos níveis plasmáticos de TGF- β , associado ao aumento nos níveis de mRNA para o colágeno I e III (Villar *et al.*, 2009). Corroborando os trabalhos da literatura, o presente estudo demonstrou que o aumento no diâmetro dos cardiomiócitos e a elevação na deposição total de colágeno após a TAC foi acompanhado pelo aumento na expressão do TGF- β no

grupo TAC em relação ao controle. É importante destacar que o tratamento oral com alamandina normalizou os níveis de expressão proteica do TGF- β , semelhante aos demais parâmetros associados ao remodelamento.

A manutenção da estrutura e função cardíacas está associada aos níveis de expressão e atividade das MMPs (Porter *et al.*, 2009). Estudos clínicos e experimentais demonstram que o aumento na expressão de MMP-2 e MMP-9, em modelos de sobrecarga de pressão, estão associados ao remodelamento e a insuficiência cardíaca. Em ratos SHR (Peterson *et al.*, 2001) e no modelo DOCA-SAL (Sakata *et al.*, 2004) foi observado elevação na expressão de MMP-2 e MMP-9 no tecido cardíaco. Além disso, elevação similar na expressão das MMPs foi observada no coração humano com estenose aórtica (Polyakova *et al.*, 2004). Embora a MMP-9 esteja envolvida no remodelamento cardíaco associado a hipertensão, Romanic e cols. demonstraram que essa isoforma de MMP é expressa principalmente por células do infiltrado inflamatório, como neutrófilos e macrófagos (Romanic *et al.*, 2002). Em contrapartida, a MMP-2 é expressa de forma ubíqua no tecido cardíaco por cardiomiócitos e fibroblastos e está associada ao remodelamento cardíaco (Cheung *et al.*, 2000). Matsusaka *et al.* demonstraram que a deleção seletiva do gene para a MMP-2 atenua o remodelamento cardíaco em quadros de sobrecarga de pressão (Matsusaka *et al.*, 2006). Esses achados estão de acordo com os resultados encontrados por Cau *et al.*, que demonstraram que a redução na atividade gelatinolítica da MMP-2 está associada à redução nos parâmetros que caracterizam o remodelamento cardíaco em animais submetidos a sobrecarga de pressão (Cau *et al.*, 2015). Corroborando os dados da literatura, no presente estudo observamos que 14 dias após a TAC houve uma elevação na expressão de MMP-2. Aqui, o resultado mais interessante observado foi que a administração oral de alamandina reduziu os níveis de expressão proteica da MMP-2, mantendo os valores próximos aos apresentados no grupo controle.

A função cardíaca depende entre outros fatores da manutenção na liberação e recaptção do cálcio intracelular, que desempenha um papel central na regulação do acoplamento excitação-contração e, portanto, do ciclo cardíaco (Morgan *et al.*, 1991). A contratilidade cardíaca depende da expressão e atividade da SERCA, que é regulada principalmente pela PLN (Simmerman *et al.*, 1998). No presente estudo avaliamos os efeitos da sobrecarga pressórica gerada pela TAC e do tratamento com alamandina na expressão da SERCA2 e fosforilação da PLN. Os animais submetidos

à TAC por 14 dias apresentaram elevação na expressão da SERCA2 em relação aos animais controle ($p < 0,05$). Interessante notar que os animais que receberam uma dose diária de alamandina também apresentaram elevação nos níveis de expressão da SERCA2 em relação aos animais controle, embora seja importante destacar que o aumento foi mais pronunciado ($p < 0,01$). De forma semelhante, Chang *et al.* demonstraram que a sobrecarga de pressão provocada pela TAC aumenta a expressão da SERCA2, associado a hipertrofia do VE (Chang *et al.*, 1997). A sobrecarga de pressão induzida pela TAC não provocou alteração na fosforilação da PLN (Thr17) e, portanto, o aumento na expressão da SERCA não foi acompanhado por elevação em sua atividade, associado à fosforilação desse resíduo na PLN. Em contrapartida, o tratamento com alamandina promoveu elevação nos níveis de fosforilação da PLN em relação aos grupos SHAM e TAC. Esse resultado sugere um papel importante da alamandina na maquinaria de Ca^{2+} intracelular, ao acentuar a elevação na expressão da SERCA2 e melhorar sua atividade ao fosforilar a PLN. Isso porque diferentes trabalhos têm mostrado que em quadros de insuficiência cardíaca e cardiopatia dilatada há redução nos níveis da SERCA2 (Mercadier *et al.*, 1990; LU *et al.*, 2011). Além disso, del Monte *et al.* demonstraram que a deleção da PLN melhora a contratilidade cardíaca no coração humano insuficiente (del Monte *et al.*, 2002). Apesar disso, estudos mais recentes têm demonstrado que a ativação constitutiva da SERCA pode ser prejudicial ao coração e provocar hipertrofia cardíaca (Shanmugam *et al.*, 2010) e, portanto, estudos adicionais são necessários para elucidar esses mecanismos, bem como a participação da alamandina nesses processos.

Por fim, nós avaliamos os efeitos da TAC na produção de EROs. A produção desses compostos é um processo que ocorre normalmente durante a fosforilação oxidativa, embora a geração excessiva provoque mutações no DNA, peroxidação lipídica, disfunção e morte celular (Giordano *et al.*, 2005). Xu *et al.* demonstraram que a produção de EROs prejudica a contratilidade ao interferir no acoplamento excitação-contracção através do transiente de cálcio (Xu *et al.*, 1997). Xie *et al.* mostraram que os radicais livres interferem na respiração mitocondrial e na produção de ATP, ocasionando disfunção contrátil, que pode ser inibida com o uso de antioxidantes (Xie *et al.*, 1998). Em modelos de sobrecarga crônica de pressão, esses compostos podem interferir na sinalização intracelular e provocar hipertrofia cardíaca (Irani *et al.*, 2000). Além disso, eles estão presentes em grandes quantidades durante a transição da

hipertrofia para a insuficiência cardíaca, por induzirem apoptose dos miócitos (Dhalla *et al.*, 1996). No presente estudo demonstramos que após 14 dias de TAC há um aumento na produção de EROs no VE de camundongos e que a administração oral de alamandina impediu o aumento desses compostos, mantendo os valores próximos ao controle.

A complexidade do SRA cresceu ao longo das últimas décadas e hoje sabe-se que as vias circulantes e teciduais são mais intrincadas do que foi previsto inicialmente. A descoberta de novos componentes desse sistema provocou mudanças substanciais em sua compreensão e a cada ano a literatura se torna mais vasta sobre os efeitos dos novos componentes. A Ang-(1-7) é um peptídeo pertencente ao eixo contra regulatório do SRA descrito há três décadas e possui ações cardioprotetoras, que incluem efeitos antiarritmogênicos (Ferreira *et al.*, 2011), vasodilatadores em coronárias (Pörsti *et al.*, 1994; Brosnihan *et al.*, 1996; Souza *et al.*, 2013), liberação de NO por ativação da eNOS (Dias-Peixoto *et al.*, 2008; Costa *et al.*, 2010), elevação na expressão da SERCA2, e portanto, aumento na amplitude do transiente de Ca^{2+} (Gomes *et al.*, 2012) e regulação dos elementos associados ao remodelamento estrutural, incluindo efeitos anti-hipertróficos, antiproliferativos e antifibróticos (Grobe *et al.*, 2006; Gomes *et al.*, 2010). Análoga da Ang-(1-7), a alamandina foi descrita mais recentemente e apresenta efeitos cardioprotetores semelhantes, embora existam poucos estudos acerca desse peptídeo. De forma interessante, Qaradakhi *et al.* demonstraram *ex vivo* que o tratamento com alamandina impede a disfunção endotelial em aorta de coelhos provocada pela homocisteína pela ativação da via da PKA, uma via que até o presente, não foi descrita pela Ang-(1-7) (Qaradakhi *et al.*, 2016). Outras ações semelhantes à Ang-(1-7) como efeitos antifibróticos e vasodilatadores (Lautner *et al.*, 2013), anti-hipertróficos (de Jesus *et al.*, 2018) e anti-inflamatórios (Li *et al.*, 2018) também já foram descritos pela alamandina. No entanto, a cada novo trabalho e modelo experimental, surgem novos participantes que são ativados pela alamandina. Portanto as ações cardioprotetoras demonstradas no presente trabalho associadas aos efeitos no remodelamento cardíaco, bem como as particularidades de cada peptídeo, reforçam a importância de novos estudos que esclareçam os mecanismos de ação da alamandina e forneçam direcionamentos futuros para a compreensão das vias de sinalização e dos mecanismos envolvidos nas respostas fisiológicas e patológicas do sistema cardiovascular.

6. Conclusões

Esse estudo demonstra, pela primeira vez, que a administração oral de alamandina em camundongos C57/BL6J impede o remodelamento cardíaco, normalizando o aumento na área transversal dos cardiomiócitos e a deposição excessiva de colágeno total e perivascular no tecido cardíaco induzidos por 14 dias de TAC. Os resultados apresentados, portanto, reforçam o efeito cardioprotetor da alamandina e sugerem um papel importante na manutenção das funções e estrutura cardíaca frente a um estímulo estressor, além de fornecer elementos que ajudam a compreender melhor as intrincadas vias de sinalização do SRA, e assim, abre novas possibilidades e perspectivas acerca das funções dos novos componentes desse sistema.

7. Perspectivas

A partir dos resultados obtidos no presente trabalho, novas questões surgiram acerca dos mecanismos celulares, moleculares e gênicos envolvidos no efeito da alamandina sobre a sobrecarga pressórica cardíaca:

- I. Avaliar a participação do receptor MrgD nos efeitos da alamandina, bem como as vias de sinalização pela qual a alamandina atua diante do estresse biomecânico.
- II. Avaliar a expressão de enzimas pró e antioxidantes para melhor compreensão do papel da alamandina no balanço redox no tecido cardíaco.

A resolução dessas e outras questões são importantes para fornecer novos direcionamentos e orientar trabalhos futuros.

8. Referências Bibliográficas

Alpert NR, Brosseau C, Federico A, Krenz M, Robbins J, Warshaw DM. Molecular mechanics of mouse cardiac myosin isoforms. *Am J Physiol: Heart Circ Physiol* 2002;283:H1446–54.

Aoki, K., YAMORI, Y., OOSHIMA, A., & OKAMOTO, K. (1972). Effects of high or low sodium intake in spontaneously hypertensive rats. *Japanese circulation journal*, 36(6), 539-545.

Arany, Zoltan, et al. "Transverse aortic constriction leads to accelerated heart failure in mice lacking PPAR- γ coactivator 1 α ." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 103.26 (2006): 10086-10091.

Asrih, Mohamed, et al. "Role of mitogen-activated protein kinase pathways in multifactorial adverse cardiac remodeling associated with metabolic syndrome." *Mediators of inflammation* 2013 (2013).

Assoian, Richard K., et al. "Transforming growth factor-beta in human platelets. Identification of a major storage site, purification, and characterization." *Journal of Biological Chemistry* 258.11 (1983): 7155-7160.

Averill, D., Ishiyama, Y., Chappell, M. and Ferrario, C. (2003) Cardiac angiotensin-(1-7) in ischemic cardiomyopathy. *Circulation* 108: 2141–2146.

Backs, Johannes, et al. "The δ isoform of CaM kinase II is required for pathological cardiac hypertrophy and remodeling after pressure overload." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 106.7 (2009): 2342-2347.

Bader M. Tissue renin-angiotensin-aldosterone systems: Targets for pharmacological therapy. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 2010; 50: 439–465.

Bader, Michael, et al. "Tissue renin-angiotensin systems: new insights from experimental animal models in hypertension research." *Journal of molecular medicine* 79.2-3 (2001): 76-102.

Bers, D.M. Calcium Fluxes Involved in Control of Cardiac Myocyte Contraction. *Circulation Research* (2000) 87:275-281.

Bers, D.M. Cardiac excitation–contraction coupling. *Nature* (2002) 415:198-205.

Bishop, Jill E., and Gisela Lindahl. "Regulation of cardiovascular collagen synthesis by mechanical load." *Cardiovascular research* 42.1 (1999): 27-44.

Bonow, Robert O., et al. *Braunwald's Heart Disease E-Book: A Textbook of Cardiovascular Medicine*. Elsevier Health Sciences, 2011.

Bradford, Marion M. "A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding." *Analytical biochemistry* 72.1-2 (1976): 248-254.

Brancaccio, Mara, et al. "Integrin signalling: the tug-of-war in heart hypertrophy." *Cardiovascular research* 70.3 (2006): 422-433.

Brand T, Schneider MD. The TGF beta superfamily in myocardium: ligands, receptors, transduction, and function. *J Mol Cell Cardiol* 1995;27:5–18.

Brand T, Sharma HS, Schaper W. Expression of nuclear proto-oncogenes in isoproterenol-induced cardiac hypertrophy. *J Mol Cell Cardiol*. 1993; 25:1325–1337.

Brooks, Wesley W., and Chester H. Conrad. "Myocardial fibrosis in transforming growth factor β 1 heterozygous mice." *Journal of molecular and cellular cardiology* 32.2 (2000): 187-195.

Brosnihan, K. B., Li, P., & Ferrario, C. M. (1996). Angiotensin-(1-7) dilates canine coronary arteries through kinins and nitric oxide. *Hypertension*, 27(3), 523-528.

Brown L, Conrad S, Newling R, Fletcher P. Cardiac responses after norepinephrine-induced ventricular hypertrophy in rats. *J Cardiovasc Pharmacol* 20: 316- 23, 1992.

Brownie AC. The adrenal cortex in hypertension. DOCA/Salt hypertension and beyond. In: *Hypertension: pathophysiology, diagnosis and management*. Laragh JH, Brenner BM (eds.). New York, Raven Press, Chapter 5: 63-77, 1990.

Bueno, O. F. et al. Impaired cardiac hypertrophic response in calcineurin A β -deficient mice. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 99, 4586–4591 (2002).

Bugaisky LB, Anderson PG, Hall RS, Bishop SP. Differences in myosin isoform expression in the subepicardial and subendocardial myocardium during cardiac hypertrophy in the rat. *Circ Res* 1990;66:1127–32.

Campagnole-Santos MJ, et al. Cardiovascular effects of angiotensin-(1-7) injected into the dorsal medulla of rats. *Am J Phys*. 1989;257(1 Pt 2):H324–9.

Campbell, D. J. "Circulating and tissue angiotensin systems." *The Journal of clinical investigation* 79.1 (1987): 1-6.

Cave AC, Grieve DJ, Johar S, et al. NADPH oxidase-derived reactive oxygen species in cardiac pathophysiology. *Philos Trans R Soc* 2005;360:2327–34.

Cau, Stefany, et al. "The Nuclear Factor kappaB Inhibitor Pyrrolidine Dithiocarbamate Prevents Cardiac Remodelling and Matrix Metalloproteinase-2 Up-Regulation in Renovascular Hypertension." *Basic & clinical pharmacology & toxicology* 117.4 (2015): 234-241.

Costa, M. A., Lopez Verrilli, M. A., Gomez, K. A., Nakagawa, P., Peña, C., Arranz, C., & Gironacci, M. M. (2010). Angiotensin-(1–7) upregulates cardiac nitric oxide synthase in spontaneously hypertensive rats. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*, 299(4), H1205-H1211.

Chang, Kevin C., et al. "Thyroid hormone improves function and Ca²⁺ handling in pressure overload hypertrophy. Association with increased sarcoplasmic reticulum

Ca²⁺-ATPase and alpha-myosin heavy chain in rat hearts." *The Journal of clinical investigation* 100.7 (1997): 1742-1749.

Chappell MC. Biochemical evaluation of the renin-angiotensin system: the good, bad, and absolute? *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2016;310(2):H137–52.

Cheung PY, Sawicki G, Wozniak M, Wang W, Radomski MW, Schulz R. Matrix metalloproteinase-2 contributes to ischemia-reperfusion injury in the heart. *Circulation*. 2000;101:1833–1839.

Cohn, J. N., Ferrari, R., & Sharpe, N. (2000). Cardiac remodeling—concepts and clinical implications: a consensus paper from an international forum on cardiac remodeling. *Journal of the American College of Cardiology*, 35(3), 569-582.

Crawford D, Chobanian A, Brecher P. Angiotensin II induces fibronectin expression associated with cardiac fibrosis in the rat. *Circ Res* 1994;74:727– 39.

Creemers, Esther E., and Yigal M. Pinto. "Molecular mechanisms that control interstitial fibrosis in the pressure-overloaded heart." *Cardiovascular research* 89.2 (2010): 265-272.

De Almeida AC, van Oort RJ, Wehrens XH. Transverse aortic constriction in mice. *Journal of visualized experiments : JoVE*. 2010(38). Epub 2010/04/23.

de Alcantara, Thais Cristina. "Papel do receptor colinérgico nicotínico $\alpha 7$ no remodelamento cardíaco induzido pela cirurgia de constrição da aorta transversa." (2015). Tese (Mestrado em fisiologia e farmacologia) Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Minas Gerais.

de Jesus, Itamar Couto Guedes, et al. "Alamandine acts via MrgD to induce AMPK/NO activation against Ang II hypertrophy in cardiomyocytes." *American Journal of Physiology-Cell Physiology* (2018).

De Mello, W. C., & Danser, A. J. (2000). Angiotensin II and the heart: on the intracrine renin-angiotensin system. *Hypertension*, 35(6), 1183-1188.

de Souza-Neto, F. P. Efeitos da Alamandina no Remodelamento Vascular Induzido pela Constrição da Aorta Transversa em Camundongos. 2017. Dissertação (Mestrado em Fisiologia) – Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

de Souza-Neto, F. P., Santuchi, M. C., e Silva, M. D. M., Campagnole-Santos, M. J., & da Silva, R. F. (2018). Angiotensin-(1–7) and Alamandine on Experimental Models of Hypertension and Atherosclerosis. *Current hypertension reports*, 20(2),

del Monte F, Harding SE, Dec GW, Gwathmey JK, Hajjar RJ. Targeting phospholamban by gene transfer in human heart failure. *Circulation* 2002;105:904–907.

- Dong, X., Han, S. K., Zylka, M. J., Simon, M. I., & Anderson, D. J. (2001). A diverse family of GPCRs expressed in specific subsets of nociceptive sensory neurons. *Cell*, 106(5), 619-632.
- Donoghue, M., Hsieh, F., Baronas, E., Godbout, K., Gosselin, M., Stagliano, N., ... & Breitbart, R. E. (2000). A novel angiotensin-converting enzyme-related carboxypeptidase (ACE2) converts angiotensin I to angiotensin 1-9. *Circulation research*, 87(5), e1-e9.
- Donoghue, M., Hsieh, F., Baronas, E., Godbout, K., Gosselin, M., Stagliano, N., Donovan, M., Woolf, B., Robison, K., Jeyaseelan, R., et al. (2000). A novel angiotensin-converting enzyme-related carboxypeptidase (ACE2) converts angiotensin I to angiotensin 1-9. *Circ. Res.* 87, E1-9.
- Dhalla AK, Hill MF, Singal PK. Role of oxidative stress in transition of hypertrophy to heart failure. *J Am Coll Cardiol* 1996; 28:506–514.
- Dias-Peixoto, M. F., Santos, R. A., Gomes, E. R., Alves, M. N., Almeida, P. W., Greco, L., & Guatimosim, S. (2008). Molecular mechanisms involved in the angiotensin-(1-7)/Mas signaling pathway in cardiomyocytes. *Hypertension*, 52(3), 542-548.
- Dzau, Victor J. "Cardiac renin-angiotensin system: molecular and functional aspects." *The American journal of medicine* 84.3 (1988): 22-27.
- Etelvino, G. M., Peluso, A. A. B., & Santos, R. A. S. (2014). New components of the renin-angiotensin system: alamandine and the MAS-related G protein-coupled receptor D. *Current hypertension reports*, 16(6), 433.
- Fedulov AV, Ses TP, Gavrisheva NA, Rybakova MG, Vassilyeva JG, Tkachenko SB, Kallner A, MacMillan JC. Serum TGF-beta 1 and TNF-alpha levels and cardiac fibrosis in experimental chronic renal failure. *Immunol Invest* 34: 143–152, 2005
- Ferrario CM, et al. Advances in the renin angiotensin system focus on angiotensin-converting enzyme 2 and angiotensin-(1-7). *Adv Pharmacol.* 2010;59:197–233.
- Ferrario CM, Carretero OA. Hemodynamics of experimental renal hypertension. In: Jong, W, editor. *Handbook of Hypertension: Experimental and Genetic Models of Hypertension*. New York: Elsevier; 1984. v.4, p.54-80.
- Ferreira, A. J., Moraes, P. L., Foureaux, G., Andrade, A. B., Santos, R. A., & Almeida, A. P. (2011). The angiotensin-(1-7)/Mas receptor axis is expressed in sinoatrial node cells of rats. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, 59(8), 761-768.
- Franchini, K. G. (2001). Hipertrofia cardíaca: mecanismos moleculares. *Rev Bras Hipertens*, 8(1), 125-42.
- FRANK, D., KUHN, C., BRORS, B., HANSELMANN, C., LÜDDE, M., KATUS, H.A., FREY, N. G. Gene Expression Pattern in Biomechanically Stretched Cardiomyocytes Evidence for a Stretch-Specific Gene Program. *Hypertension* (2008) 51(2):309:318.
- Frey, NaENO, and E. N. Olson. "Cardiac hypertrophy: the good, the bad, and the ugly." *Annual review of physiology* 65.1 (2003): 45-79.

Frohlich, Edward D., et al. "The heart in hypertension." *New England Journal of Medicine* 327.14 (1992): 998-1008.

Galandrin, S., Denis, C., Boullaran, C., Marie, J., M'Kadmi, C., Pilette, C., Dubroca, C., Nicaise, Y., Seguelas, M.-H., N'Guyen, D., et al. (2016). Cardioprotective Angiotensin-(1-7) Peptide Acts as a Natural-Biased Ligand at the Angiotensin II Type 1 Receptor. *Hypertens. Dallas Tex* 1979 68, 1365–1374.

Garcia, J. A. D., & Incerpi, E. K. (2008). Fatores e mecanismos envolvidos na hipertrofia ventricular esquerda e o papel anti-hipertrofico do óxido nítrico. *Arquivos Brasileiros de Cardiologia*, 90(6), 443-450.

Giordano FJ. Oxygen, oxidative stress, hypoxia, and heart failure. *J Clin Invest.* 2005;115:500–508.

Gomes, Enéas RM, et al. "Angiotensin-(1-7) Prevents Cardiomyocyte Pathological Remodeling Through a Nitric Oxide/Guanosine 3', 5'-Cyclic Monophosphate-Dependent Pathway." *Hypertension* 55.1 (2010): 153-160.

Gomes, E. R., Santos, R. A., & Guatimosim, S. (2012). Angiotensin-(1-7)-mediated signaling in cardiomyocytes. *International journal of hypertension*, 2012.

Gonzalez AA, Prieto MC. Roles of collecting duct renin and (pro)renin receptor in hypertension: mini review. *Ther Adv Cardiovasc Dis.* 2015;9(4):191–200.

Griendling, K. K., Murphy, T. J., & Alexander, R. W. (1993). Molecular biology of the renin-angiotensin system. *Circulation*, 87(6), 1816-1828.

Grobe, Justin L., et al. "Chronic angiotensin-(1–7) prevents cardiac fibrosis in DOCA-salt model of hypertension." *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology* 290.6 (2006): H2417-H2423.

Grobe, J. L., Mecca, A. P., Lingis, M., Shenoy, V., Bolton, T. A., Machado, J. M., ... & Katovich, M. J. (2007). Prevention of angiotensin II-induced cardiac remodeling by angiotensin-(1–7). *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*, 292(2), H736-H742.

Gupta, Mahesh P. "Factors controlling cardiac myosin-isoform shift during hypertrophy and heart failure." *Journal of molecular and cellular cardiology* 43.4 (2007): 388-403.

GUNTHER S, GROSSMAN W. Determinants of ventricular function in pressure-overload hypertrophy in man. *Circulation.* 1979;59:679–688.

Hamawaki, Masayoshi, et al. "Pressure-overload hypertrophy is unabated in mice devoid of AT1A receptors." *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology* 274.3 (1998): H868-H873.

Harada, Koichiro, et al. "Pressure overload induces cardiac hypertrophy in angiotensin II type 1A receptor knockout mice." *Circulation* 97.19 (1998): 1952-1959.

Heineke, J. & Molkentin, J.D. Regulation of cardiac hypertrophy by intracellular signaling pathways. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* 7, 589-600 (2006).

Hoh JFY, McGrath PA, Hale FT (1977) Electrophoretic analysis of multiple forms of rat cardiac myosin: Effects of hypophysectomy and thyroxine replacement. *J Mol Cell Cardiol* 10: 1053-1076

Hu, Zhenyu, et al. "Aberrant Splicing Promotes Proteasomal Degradation of L-type Ca V 1.2 Calcium Channels by Competitive Binding for Ca V β Subunits in Cardiac Hypertrophy." *Scientific reports* 6 (2016): 35247.

Imamura T, McDermott PJ, Kent RL, et al. Acute changes in myosin heavy chain synthesis rate in pressure versus volume overload. *Circ Res.* 1994;75:418–425.

Irani K. Oxidant signaling in vascular cell growth, death, and survival: a review of the roles of reactive oxygen species in smooth muscle and endothelial cell mitogenic and apoptotic signaling. *Circ Res* 2000; 87:179–183.

Iwai, Naoharu, Hitoshi Shimoike, and Masahiko Kinoshita. "Cardiac renin-angiotensin system in the hypertrophied heart." *Circulation* 92.9 (1995): 2690-2696.

Jankowski V, Vanholder R, van der Giet M, et al. Massspectrometric identification of a novel angiotensin peptide in human plasma. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2007; 27: 297–302.

Janmey PA. The cytoskeleton and cell signaling: component localization and mechanical coupling. *Physiol Rev* 78: 763-81, 1998.

Jessup M., Brozena S.; Heart Failure. *N Engl J Med* 2003;348:2007- 18.

Johnston, Colin I. "Franz Volhard Lecture. Renin-angiotensin system: a dual tissue and hormonal system for cardiovascular control." *Journal of hypertension. Supplement: official journal of the International Society of Hypertension* 10.7 (1992): S13-26.

Jones, E.S., Vinh, A., McCarthy, C.A., Gaspari, T.A., and Widdop, R.E. (2008). AT2 receptors: functional relevance in cardiovascular disease. *Pharmacol. Ther.* 120, 292–316.

Katoh Y, Komuro I, Yamaguchi H, Yazaki Y. Molecular mechanism of hypertrophied failing heart abnormalities of the diastolic properties and contractility. *Jpn Circ J* 56: 694-700, 1992

Kinugawa S, Tsutsui H, Hayashidani S, Ide T, Suematsu N, Satoh S, et al. Treatment with dimethylthiourea prevents left ventricular remodeling and failure after experimental myocardial infarction in mice: role of oxidative stress. *Circ Res* 2000; 87:392–398.

Korte, F. Steven, et al. "Power output is linearly related to MyHC content in rat skinned myocytes and isolated working hearts." *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology* 289.2 (2005): H801-H812.

Kuang, S.-Q., Geng, L., Prakash, S.K., Cao, J.-M., Guo, S., Villamizar, C., Kwartler, C.S., Peters, A.M., Brasier, A.R., and Milewicz, D.M. (2013). Aortic remodeling after transverse aortic constriction in mice is attenuated with AT1 receptor blockade. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 33, 2172–2179.

Lautner, R. Q., Vilella, D. C., Fraga-Silva, R. A., Silva, N., Verano-Braga, T., Costa-Fraga, F., ... & Soares, E. (2013). Discovery and Characterization of Alamandine Novelty and Significance: A Novel Component of the Renin–Angiotensin System. *Circulation research*, 112(8), 1104-1111.

Lee, R. et al. Evaluating oxidative stress in human cardiovascular disease: methodological aspects and considerations. *Current medicinal chemistry*, v. 19, n. 16, p. 2504-2520, 2012.

Levy D, Garrison RJ, Savage DD, Kannel WB, Castelli WP Prognostic implication of echocardiographically determined left ventricular mass in the Framingham Heart Study. *N Engl J Med* 322: 1561–1566 (1990).

Li, P., Chen, X. R., Xu, F., Liu, C., Li, C., Liu, H., ... & Kong, X. Q. (2018). Alamandine attenuates sepsis-associated cardiac dysfunction via inhibiting MAPKs signaling pathways. *Life Sciences*.

Lips, Daniel J., et al. "Molecular determinants of myocardial hypertrophy and failure: alternative pathways for beneficial and maladaptive hypertrophy." *European heart journal* 24.10 (2003): 883-896.

Litten III RZ, Martin BJ, Low RB, Alpert NR. Altered myosin isozyme patterns from pressure-overloaded and thyrotoxic hypertrophied rabbit hearts. *Circ Res* 1982;50:856–64.

Lilly, L. S., et al. "Cultured Vascular Endothelial-cells Contain the Complete Renin-Angiotensin System." *Clinical Research*. Vol. 31. No. 2. 6900 GROVE RD, Thorofare, NJ 08086: SLACK INC, 1983.

Lompre AM, Schwartz K, d'Albis A, Lacombe G, Thiem NV, Swynghedauw B (1979) Myosin isoenzyme redistribution in chronic heart overload. *Nature* 282: 105-107

Loell, B.H., Carabello, B.A. Left Ventricular Hypertrophy Pathogenesis, Detection, and Prognosis. *Circulation* (2000) 102:470-479.

Lu, Y., Huang, J., Shioda, N., Fukunaga, K., Shirasaki, Y., Li, X., Han, F. CaMKII δ B Mediates Aberrant NCX1 Expression and the Imbalance of NCX1/SERCA in Transverse Aortic Constriction-Induced Failing Heart. *Plos One* (2011) 6:1-12.

MacCarthy, Philip A., and Ajay M. Shah. "Oxidative stress and heart failure." *Coronary artery disease* 14.2 (2003): 109-113.

Maillet, M., Van Berlo, J. H., & Molkenin, J. D. (2013). Molecular basis of physiological heart growth: fundamental concepts and new players. *Nature reviews Molecular cell biology*, 14(1), 38.

Maniotis AJ, Chen CS, Ingber DE. Demonstration of mechanical connections between integrins, cytoskeletal filaments, and nucleoplasm that stabilize nuclear structure. *Proc Natl Acad Sci* 94: 849-54, 1997.

Marques, F., Melo, M., Souza, L., Irigoyen, M., Sinisterra, R., De Sousa, F. et al. (2012) Beneficial effects of long-term administration of an oral formulation of angiotensin-(1-7) in infarcted rats. *Int J Hypertens* 2012: 795452.

Massague, Joan. "The TGF- β family of growth and differentiation factors." *Cell* 49.4 (1987): 437-438.

Massague, Joan. "The transforming growth factor-beta family." *Annual review of cell biology* 6.1 (1990): 597-641.

Matsubara, B. B., & Matsubara, L. S. (2003). Mecanismos de hipertrofia e fibrose na hipertensão arterial sistêmica. *Rev. Soc. Cardiol. Estado de São Paulo*, 13(1), 92-103.

Mendoza-Torres, E., Oyarzún, A., Mondaca-Ruff, D., Azocar, A., Castro, P. F., Jalil, J. E., ... & Ocaranza, M. P. (2015). ACE2 and vasoactive peptides: novel players in cardiovascular/renal remodeling and hypertension. *Therapeutic advances in cardiovascular disease*, 9(4), 217-237.

Mercadier JJ, Lompre AM, Duc P, Boheler KR, Fraysse JB, Wisnewsky C, Allen PD, Komajda M, Schwartz K. Altered sarcoplasmic reticulum Ca₂-ATPase gene expression in the human ventricle during end-stage heart failure. *J Clin Invest* 1990;85:305–309.

Mercure, Chantal, et al. "Angiotensin (1-7) blunts hypertensive cardiac remodeling by a direct effect on the heart." *Circulation research* 103.11 (2008): 1319-1326.

Milasta, S., Pediani, J., Wilson, S., Trim, S., Wyatt, M., Cox, P., ... & Milligan, G. (2005). Interactions between the Mas-related receptors MrgD and MrgE alter signalling and trafficking of MrgD. *Molecular pharmacology*.

Mill, J. G., & Vassallo, D. V. (2001). Hipertrofia cardíaca. *Rev Bras Hipertens*, 8(1), 18-29.

Miyata S, Minobe W, Bristow MR, Leinwand LA. Myosin heavy chain isoform expression in the failing and nonfailing human heart. *Circ Res* 2000;86:386–90.

Molkentin, Jeffery D., et al. "A calcineurin-dependent transcriptional pathway for cardiac hypertrophy." *Cell* 93.2 (1998): 215-228.

Morgan, James P. "Abnormal intracellular modulation of calcium as a major cause of cardiac contractile dysfunction." *New England Journal of Medicine* 325.9 (1991): 625-632.

Moriguchi Y, Matsubara H, Mori Y, et al. Angiotensin II-induced transactivation of epidermal growth factor receptor regulates fibronectin and transforming growth factor-beta synthesis via transcriptional and posttranscriptional mechanisms. *Circ Res* 1999;84: 1073– 84.

McCollum, LaTronya T., Patricia E. Gallagher, and E. Ann Tallant. "Angiotensin-(1–7) attenuates angiotensin II-induced cardiac remodeling associated with upregulation of dual-specificity phosphatase 1." *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology* 302.3 (2011): H801-H810.

McCollum, L., Gallagher, P. and Tallant, E. (2012) Angiotensin-(1-7) abrogates mitogen-stimulated proliferation of cardiac fibroblasts. *Peptides* 34: 380–388.

Musumeci, Marco, et al. "Signaling pathway-focused gene expression profiling in pressure overloaded hearts." *Annali dell'Istituto superiore di sanit * 47.3 (2011): 290-295.

Nakajima, Hidehiro, et al. "Atrial but not ventricular fibrosis in mice expressing a mutant transforming growth factor- β 1 transgene in the heart." *Circulation research* 86.5 (2000): 571-579.

Nishida, M., Sato, Y., Uemura, A., Narita, Y., Tozaki-Saitoh, H., Nakaya, M., & Kurose, H. (2008). P2Y6 receptor-G α 12/13 signalling in cardiomyocytes triggers pressure overload-induced cardiac fibrosis. *The EMBO journal*, 27(23), 3104-3115.

Nouet, S., and Nahmias, C. (2000). Signal transduction from the angiotensin II AT2 receptor. *Trends Endocrinol. Metab.* TEM 11, 1–6. Suzuki, J., Iwai, M., Nakagami, H., Wu, L., Chen, R., Sugaya, T., Hamada, M., Hiwada, K., and Horiuchi, M. (2002).

Oliveira, A. C. Distribui o e aspectos morfofuncionais do receptor de alamandina, MrgD, em roedores. 2016. Disserta o (Doutorado em Fisiologia) – Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

Patel, V., Bodiga, S., Basu, R., Das, S., Wang, W., Wang, Z. et al. (2012) Loss of angiotensin-converting enzyme-2 exacerbates diabetic cardiovascular complications and leads to systolic and vascular dysfunction: a critical role of the angiotensin II/AT1 receptor Axis. *Circ Res* 110: 1322–1335.

Peterson JT, Hallak H, Johnson L, Li H, O'Brien PM, Sliskovic DR, Bocan TM, Coker ML, Etoh T, Spinale FG. Matrix metalloproteinase inhibition attenuates left ventricular remodeling and dysfunction in a rat model of progressive heart failure. *Circulation*. 2001; 103:2303–2309.

Peterson MC. Circulating transforming growth factor beta-1: a partial molecular explanation for associations between hypertension, diabetes, obesity, smoking and human disease involving fibrosis. *Med Sci Monit* 11: RA229–RA232, 2005

Polyakova V, Hein S, Kostin S, Ziegelhoeffer T, Schaper J. Matrix metalloproteinases and their tissue inhibitors in pressure-overloaded human myocardium during heart failure progression. *J Am Coll Cardiol*. 2004;44:1609 –1618.

P rsti, I., Bara, A. T., Busse, R., & Hecker, M. (1994). Release of nitric oxide by angiotensin-(1–7) from porcine coronary endothelium: implications for a novel angiotensin receptor. *British journal of pharmacology*, 111(3), 652-654.

Price RL, Carver W, Simpson DG, Fu L, ZhaoJ, Borg TK, Terracio L. The effects of angiotensin II and specific angiotensin receptors blockers on embryonic cardiac development and looping patterns. *Dev Biol*. 1997; 192:572–584.

Qaradakhi Tawar, E.-H.A., Hayes Alan, Rybalka Emma, Smith Renee, Kruzliak Peter, Zulli Anthony, Alamandine reverses homocysteine-induced endothelial dysfunction via

PKA dependent mechanisms. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*, 2016

Raffetto, J. D., & Khalil, R. A. (2008). Matrix metalloproteinases and their inhibitors in vascular remodeling and vascular disease. *Biochem Pharmacol* 75, 346–359.

Remme, W. J. "Pharmacological modulation of cardiovascular remodeling: a guide to heart failure therapy." *Cardiovascular drugs and therapy* 17.4 (2003): 349-360.

Rockman, H.A., Ross, R.S., Harris, A.N., Knowlton, K.U., Steinhilber, M.E., Field, L.J., Jr., J.R., & Chein, K.R. Segregation of atrial-specific and inducible expression of an atrial natriuretic factor transgene in an in vivo murine model of cardiac hypertrophy. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 88, 8277-8281 (1991).

Rose, Beth A., Thomas Force, and Yibin Wang. "Mitogen-activated protein kinase signaling in the heart: angels versus demons in a heart-breaking tale." *Physiological reviews* 90.4 (2010): 1507-1546.

Rüdebusch, Julia, et al. "Dynamic adaptation of myocardial proteome during heart failure development." *PLoS one* 12.10 (2017): e0185915.

Richard, R. E. "The myocardial intracellular renin-angiotensin system." *American Journal of Cardiology* 59.2 (1987): A56-A58.

Sadoshima, J. I., Xu, Y., Slayter, H. S., & Izumo, S. (1993). Autocrine release of angiotensin II mediates stretch-induced hypertrophy of cardiac myocytes in vitro. *Cell*, 75(5), 977-984.

Sakata Y, Yamamoto K, Mano T, Nishikawa N, Yoshida J, Hori M, Miwa T, Masuyama T. Activation of matrix metalloproteinases precedes left ventricular remodeling in hypertensive heart failure rats: its inhibition as a primary effect of Angiotensin-converting enzyme inhibitor. *Circulation*. 2004;109:2143–2149.

Santos, R. A. (2014). Angiotensin-(1–7). *Hypertension*, 63(6), 1138-1147.

Santos RaS, Ferreira AJ, Simões E, Silva AC. Recent advances in the angiotensin-converting enzyme 2-angiotensin(1-7)-Mas axis. *Exp Physiol* 2008; 93:519–527.

Santos RA, Brosnihan KB, Chappell MC, Pesquero J, Chernicky CL, Greene LJ, et al. Converting enzyme activity and angiotensin metabolism in the dog brainstem. *Hypertension*. 1988;11(2 Pt 2): 1153–1157.

Santos, Robson AS, et al. "Angiotensin-(1–7) is an endogenous ligand for the G protein-coupled receptor Mas." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 100.14 (2003): 8258-8263.

Santos, Robson Augusto, Cristiane R. Fagundes Moura, and Ana Cristina Simões Silva. "Efeitos cardiovasculares e renais do sistema renina-angiotensina." *Rev. bras. hipertens* 7.3 (2000): 227-236.

Santos, R. A., et al. "Converting enzyme activity and angiotensin metabolism in the dog brainstem." *Hypertension* 11.2 Pt 2 (1988): 1153.

Sawyer DB, Siwik DA, Xiao L, Pimentel DR, Singh K, Colucci WS. Role of oxidative stress in myocardial hypertrophy and failure. *J Mol Cell Cardiol.* 2002;34:379–388.

Semple, Peter F., et al. "Angiotensin II and its heptapeptide (2-8), hexapeptide (3-8), and pentapeptide (4-8) metabolites in arterial and venous blood of man." *Circulation Research* 39.5 (1976): 671-678.

Serner, Gian Gastone Neri, et al. "Evidence for the existence of a functional cardiac renin-angiotensin system in humans." *Circulation* 94.8 (1996): 1886-1893.

Shanmugam, Mayilvahanan, et al. "Ablation of phospholamban and sarcolipin results in cardiac hypertrophy and decreased cardiac contractility." *Cardiovascular research* 89.2 (2010): 353-361.

Simmerman HK, Jones LR. Phospholamban: protein structure, mechanism of action, and role in cardiac function. *Physiol Rev* 1998;78: 921–947.

Siqueira, A. D. S. E., de Siqueira-Filho, A. G., & Land, M. G. P. (2017). Análise do Impacto Econômico das Doenças Cardiovasculares nos Últimos Cinco Anos no Brasil. *Arq Bras Cardiol*, 109(1), 39-46.

Soares ER, Barbosa CM, Campagnole-Santos MJ, Santos RAS, Alzamora AC. Hypotensive effect induced by microinjection of Alamandine, a derivative of angiotensin-(1-7), into caudal ventrolateral medulla of 2K1C hypertensive rats. *Peptides*. 2017;96:67

Soltani Hekmat A, Javanmardi K, Kouhpayeh A, Baharamali E, Farjam M. Differences in cardiovascular responses to alamandine in two-kidney, one clip hypertensive and normotensive rats. *Circ J.* 2017;81(3):405–12.

Stock, Philippe, et al. "Local renin-angiotensin systems in cardiovascular tissues: localization and functional role." *Cardiology* 86.Suppl. 1 (1995): 2-8.

Souza, Á. P., Sobrinho, D. B., Almeida, J. F., Alves, G. M., Macedo, L. M., Porto, J. E., & Mendes, E. P. (2013). Angiotensin II type 1 receptor blockade restores angiotensin-(1–7)-induced coronary vasodilation in hypertrophic rat hearts. *Clinical Science*, 125(9), 449-459.

Sugden PH, Clerk A. "Stress-responsive" mitogen-activated protein kinases (c-Jun N-terminal kinases and p38 mitogen-activated protein kinases) in the myocardium. *Circ Res.* 1998;24:345–352.

Sutton M.G.S.J.; Sharpe N.; Left ventricular remodeling after myocardial infarction: pathophysiology and therapy. *Circulation* 2000;101:2981- 88.

Swynghedauw, Bernard. "Molecular mechanisms of myocardial remodeling" *Physiological reviews* 79.1 (1999): 215-262.

Takeishi, Y., Huang, Q., Abe, J. I., Glassman, M., Che, W., Lee, J. D., ... & Walsh, R. A. (2001). Src and multiple MAP kinase activation in cardiac hypertrophy and congestive heart failure under chronic pressure-overload: comparison with acute mechanical stretch. *Journal of molecular and cellular cardiology*, 33(9), 1637-1648.

- Tigerstedt, Robert, and P. Q. Bergman. "Niere und kreislauf." *Acta Physiologica* 8.1 (1898): 223-271.
- Tokuda K, Kai H, Kuwahara F, et al. Pressure-independent effects of angiotensin II on hypertensive myocardial fibrosis. *Hypertension* 2004;43:499– 503.
- Tsutsumi, Y., Matsubara, H., Masaki, H., Kurihara, H., Murasawa, S., Takai, S., Miyazaki, M., Nozawa, Y., Ozono, R., Nakagawa, K., et al. (1999). Angiotensin II type 2 receptor overexpression activates the vascular kinin system and causes vasodilation. *J. Clin. Invest.* 104, 925–935. of angiotensin II-regulated apoptosis through distinct AT1 and AT2 receptors in neointimal formation. *Circulation* 106, 847–853.
- Tsutsumi, K.E.I.S.U.K.E., and JUAN M. Saavedra. "Characterization and development of angiotensin II receptor subtypes (AT1 and AT2) in rat brain." *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* 261.1 (1991): R209-R216.
- Van Oort, R. J., & Wehrens, X. H. (2010). Transverse aortic constriction in mice. *Journal of visualized experiments: JoVE*, (38).
- Ventura-Clapier R, Mekhfi H, Oliviero P, Swynghedauw B. Pressure overload changes cardiac skinned-fiber mechanics in rats, not in guinea-pigs. *Am J Physiol* 254: H517-H524, 1988.
- Vassallo DV, Vasquez EC, Mill JG, Cabral, AM. Time course effects of sinoaortic denervation on the contractile state of the myocardium. *Am J Physiol* 261; *Heart Circ Physiol* 30: H639-H643, 1991.
- Vassallo DV, Vasquez EC, Cabral AM. Contractile performance of papillary muscles of renovascular hypertensive and isoproterenol-pretreated rats. *Pharmacol Res Comm* 20: 61-72, 1988
- Villela, D.C.; Passos-Silva, D.G.; Santos, R.A.; Alamandine: a new member of the angiotensin family. *Curr Opin Nephrol Hypertens.* 2014 March; 23(2): 130-4.
- Villar, Ana V., et al. "Plasma levels of transforming growth factor- β 1 reflect left ventricular remodeling in aortic stenosis." *PLoS One* 4.12 (2009): e8476.
- Xia, Y., Lee, K., Li, N., Corbett, D., Mendoza, L., & Frangogiannis, N. G. (2009). Characterization of the inflammatory and fibrotic response in a mouse model of cardiac pressure overload. *Histochemistry and cell biology*, 131(4), 471-481.
- Xie, Yi-Wu, Pawel M. Kaminski, and Michael S. Wolin. "Inhibition of rat cardiac muscle contraction and mitochondrial respiration by endogenous peroxynitrite formation during posthypoxic reoxygenation." *Circulation research* 82.8 (1998): 891-897.
- Xu, Kai Y., Jay L. Zweier, and Lewis C. Becker. "Hydroxyl radical inhibits sarcoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase function by direct attack on the ATP binding site." *Circulation research* 80.1 (1997): 76-81.

Wang, Bin, et al. "Aerobic exercise protects against pressure overload-induced cardiac dysfunction and hypertrophy via β 3-AR-nNOS-NO activation." *PloS one* 12.6 (2017): e0179648.

Weber KT, Sun Y, Tyagi SC, Cleutjens JP. Collagen network of the myocardium: function, structural remodeling and regulatory mechanisms. *J Mol Cell Cardiol* 1994;26: 279–292.

Wikman-Coffelt, J. O. A. N., WILLIAM W. Parmley, and DEAN T. Mason. "The cardiac hypertrophy process. Analyses of factors determining pathological vs. physiological development." *Circulation research* 45.6 (1979): 697-707.

Willenheimer, R. (2000). Left ventricular remodelling and dysfunction: Can the process be prevented?. *International journal of cardiology*, 72(2), 143-150.

Witt, S. A., and B. J. Glascock. "TGF-beta1 mediates the hypertrophic cardiomyocyte growth induced by angiotensin II ." *J Clin Invest* 109.11 (2002): 787-796.

Wright, J.W., Mizutani, S., and Harding, J.W. (2008). Pathways involved in the transition from hypertension to hypertrophy to heart failure. *Treatment strategies. Heart Fail. Rev.* 13, 367–375.

Zhang, L., Taylor, N., Xie, Y., Ford, R., Johnson, J., Paulsen, J. E., & Bates, B. (2005). Cloning and expression of MRG receptors in macaque, mouse, and human. *Molecular brain research*, 133(2), 187-197.

Zimmer HG. Catecholamine-induced cardiac hypertrophy: significance of proto-oncogene expression. *J Mol Med.* 1997;75:849–859.

Zylka, M. J., Dong, X., Southwell, A. L., & Anderson, D. J. (2003). Atypical expansion in mice of the sensory neuron-specific Mrg G protein-coupled receptor family. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 100(17), 10043-10048.