

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

**ANGIOTENSINA-(1-7): EFEITOS SINÉRGICOS E ANTAGÔNICOS  
SOBRE A SINALIZAÇÃO DA ALDOSTERONA NO  
CARDIOMIÓCITO**

Pedro William Machado de Almeida

Belo Horizonte

2015

Pedro William Machado de Almeida

**ANGIOTENSINA-(1-7): EFEITOS SINÉRGICOS E ANTAGÔNICOS  
SOBRE A SINALIZAÇÃO DA ALDOSTERONA NO  
CARDIOMIÓCITO**

Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação em Fisiologia e Farmacologia do Departamento de Fisiologia e Biofísica Do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais para obtenção do título de Doutor

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Silvia Guatimosim

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

Belo Horizonte

2015

**“Feliz aquele que transfere o que sabe e aprende o que ensina...”**  
***Cora Coralina***

## DEDICATÓRIA

**À Deus e Nossa Senhora,**

Por sempre me abençoar e iluminar meu caminho.

**À minha família (Pai, Mãe, Bruno, tia Nega)**

Por ser meu alicerce, minha maior alegria e pela dedicação de todos ao longo da vida.

**À Mariana,**

Pelo amor incondicional , paciência e companheirismo em todos os momentos.

**A todos os meus verdadeiros amigos,**

Que sempre me ajudaram e torceram por mim.

## **AGRADECIMENTOS**

### **A minha orientadora Silvia,**

Pela oportunidade, pelos ensinamentos transmitidos, confiança depositada, por me fazer ser melhor a cada dia, pela amizade e por ser a minha grande referência na pesquisa.

### **Ao meu co-orientador Robson,**

Pelas orientações, colaborações e por disponibilizar os recursos do Laboratório de Hipertensão.

### **Ao Ricardo,**

Obrigado pela amizade e por todos os ensinamentos passados além das infundáveis discussões sobre pesquisa

### **Ao Fabrício,**

Meu irmão, sempre me direcionando e me auxiliando em todos os momentos, Muito obrigado!

### **Ao Léo,**

Que mesmo fora do Laboratório continua participando do meu desenvolvimento profissional, pela lealdade e por me acompanhar nessa difícil trajetória. Valeu!

### **Ao Rodrigo Resende,**

Obrigado pela sua amizade e disponibilidade sempre.

### **A Amanda e ao Dudu,**

Um agradecimento especial aos amigos inseparáveis, parceiros de laboratório e da vida. Muito obrigado pela ajuda, disponibilidade, amizade.

### **Ao Clóvis e aos membros do Efeito Personal Studio (Elton, Carlos, André).**

Por cuidarem do meu corpo e da minha mente.

### **A todos da família eletrocel, antigos e nova geração cada um com sua peculiaridade.**

Por fazerem do laboratório um ambiente tão agradável de trabalhar.

Aline, Enéas, Felipe, Marcinha, Adriano, Sasha, Thaís, Itamar, Sérgio, Isabelas, Vanessa, Daisy, Luciana, Marina, Diogo, Eder, Cibele, Chris, Miguel, Leida, Lígia.

### **Ao laboratório de hipertensão,**

Principalmente ao Marcos e a professor Maria José pela disponibilidade, ensinamentos, discussões. Obrigado!

**A Bônia, Mônica e Silvio.**

Seres humanos únicos pelo caráter, disponibilidade e ajuda. Meu muitíssimo obrigado de coração. Sem vocês o trabalho seria impossível.

**Aos professores e amigos Ary, Guilherme, Emerson Silami, Alessandra.**

Responsáveis diretos pelo meu início e desenvolvimento na pesquisa. Principalmente ao Professor Emerson por ser a minha inspiração. Profissional e amigo exemplar. Obrigado por me adotar como filho. Se realizar um décimo do que você fez ao longo da vida profissional ficarei muito satisfeito. Meus sinceros agradecimentos.

**Aos Porteiros do ICB.**

Carlos, Serafim pelas brincadeiras e alegria sempre.

**A todos os amigos que fiz no departamento.**

Em especial ao Zé Felipe amigo e parceiro de pesquisa. Obrigado pelas facilidades criadas ao longo desses anos. Muito obrigado.

## SUMÁRIO

Lista de figuras.....	IX
Lista de tabelas.....	XI
Lista de Abreviaturas.....	XII
Resumo.....	XVII
Abstract.....	XIX
<b>1. Introdução.....</b>	<b>1</b>
<b>2. Revisão de literatura.....</b>	<b>3</b>
2.1 Aldosterona.....	3
2.2 Consequências desencadeadas pelo excesso de aldosterona.....	9
2.3 Mecanismos de ação intracelular da aldosterona.....	10
2.3.1 Ação genômica da aldosterona.....	10
2.3.2 Ação não genômica da aldosterona.....	12
2.4 Peptídeos do SRAA e sinalização da aldosterona.....	15
2.5 Efeitos diretos da aldosterona no cardiomiócito.....	16
2.6 Disfunção na sinalização de $Ca^{2+}$ modelo de hipertensão arterial.....	21
2.7 Vias de sinalização ativadas pela angiotensina-(1-7) no cardiomiócito.....	22
<b>3. Objetivos.....</b>	<b>29</b>
3.1 Objetivo geral.....	29
3.2 Objetivos específicos.....	29
<b>4. Materiais e métodos.....</b>	<b>31</b>
4.1 Animais.....	31
4.2 Grupos experimentais.....	31
4.3 Inidores utilizados nos protocolos experimentais em cardiomiócitos.....	31
4.4. Isolamento dos cardiomiócitos ventriculares adultos e medida do transiente de $Ca^{2+}$ .....	32
4.5 Medida do conteúdo de $Ca^{+2}$ do retículo sarcoplasmático (RS).....	33
4.6 Medida e análise das sparks espontâneas de $Ca^{2+}$ .....	33

4.7	Medida da produção de óxido nítrico (ON).....	35
4.8	Tratamento das células para medida da produção de EROS.....	35
4.9	Western blotting.....	35
4.10	Imunofluorescência.....	37
4.11	Extração de RNA, transcrição reversa e PCR em tempo real.....	37
4.12	Eletrofisiologia celular.....	39
4.12.1	técnica whole-cell patch clamp.....	39
4.12.2	Medida da corrente de cálcio tipo I ( $i_{Ca,I}$ ).....	40
4.12.3	Análise biofísica das correntes iônicas.....	40
4.13	Análise estatística.....	41
<b>5.</b>	<b>Resultados.....</b>	<b>42</b>
<b>6.</b>	<b>Discussão.....</b>	<b>65</b>
<b>7.</b>	<b>Conclusão.....</b>	<b>75</b>
<b>8.</b>	<b>Referências bibliográficas.....</b>	<b>76</b>
<b>Anexo 1</b>	<b>.....</b>	<b>99</b>
<b>Anexo 2</b>	<b>.....</b>	<b>100</b>



## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1:</b> Fórmula química da aldosterona.....	<b>3</b>
<b>Figura 2:</b> Biossíntese de aldosterona e cortisol no córtex da adrenal humana.....	<b>6</b>
<b>Figura 3:</b> Acoplamento EC no cardiomiócito.....	<b>19</b>
<b>Figura 4:</b> Efeitos do óxido nítrico sobre a fisiologia do cardiomiócito e sua interação com vias oxidativas.....	<b>25</b>
<b>Figura 5:</b> Ratos que superexpressam Ang-(1-7) estão protegidos das alterações cardíacas induzidas pelo modelo de hipertensão DOCA-sal.....	<b>27</b>
<b>Figura 6:</b> Alterações no perfil de proteínas envolvidas no manejo do cálcio em cardiomiócitos de ratos DOCA-sal são prevenidas nos ratos TG.....	<b>28</b>
<b>Figura 7:</b> Transiente de cálcio em cardiomiócitos (F/F <sub>0</sub> ).....	<b>33</b>
<b>Figura 8:</b> Protocolo de eletrofisiologia.....	<b>40</b>
<b>Figura 9:</b> Aldosterona aumenta a magnitude do transiente de Ca <sup>2+</sup> em cardiomiócitos.....	<b>42</b>
<b>Figura 10:</b> <i>Cross-talk</i> entre aldosterona e Ang-(1-7) aumenta o transiente de Ca <sup>2+</sup> em miócitos ventriculares.....	<b>43</b>
<b>Figura 11:</b> Os efeitos da Ang-(1-7) no transiente de Ca <sup>2+</sup> em células tratadas com aldosterona são mediados pelo receptor Mas.....	<b>45</b>
<b>Figura 12:</b> Ang-(1-7) não altera I <sub>Ca,L</sub> em miócitos ventriculares.....	<b>46</b>
<b>Figura 13:</b> Aldosterona aumenta I <sub>Ca,L</sub> em miócitos ventriculares.....	<b>47</b>
<b>Figura 14:</b> PKA é um mediador dos efeitos sinérgicos da aldosterona e Ang-(1-7) no transiente de Ca <sup>2+</sup> .....	<b>49</b>
<b>Figura 15:</b> Ang-(1-7) previne o aumento da taxa <i>Sparks</i> de Ca <sup>2+</sup> em cardiomiócitos tratados com aldosterona.....	<b>51</b>
<b>Figura 16:</b> Ang-(1-7) previne o aumento dos níveis de EROS desencadeado pela aldosterona em cardiomiócitos.....	<b>52</b>
<b>Figura 17:</b> Ang-(1-7) aumenta os níveis de nitrotirosina em miócitos tratados com aldosterna.....	<b>53</b>

<b>Figura 18:</b> Ang-(1-7) aumenta a liberação de ON em miócitos tratados com aldosterona.....	<b>54</b>
<b>Figura 19:</b> Os níveis de fosforilação das isoformas NOS1 e 3 estão alterados nos miócitos ventriculares tratados com aldosterona/Ang-(1-7).....	<b>56</b>
<b>Figura 20:</b> Ang-(1-7) ativa a NOS1 em cardiomiócitos.....	<b>57</b>
<b>Figura 21:</b> A Inibição de NOS1 com seu bloqueador específico L-Arg NO2-L-Dbu reduziu significativamente o efeito de Ang-(1-7) na amplitude transiente de Ca <sup>2+</sup> em miócitos tratados com aldosterona.....	<b>58</b>
<b>Figura 22:</b> ON é importante mediador dos efeitos da Ang-(1-7) sobre a sinalização de Ca <sup>2+</sup> em cardiomiócitos tratados com aldosterona.....	<b>59</b>
<b>Figura 23:</b> Aldosterona e Ang-(1-7) modulam os níveis de transcrição gênica de ANP e β-MHC.....	<b>60</b>
<b>Figura 24:</b> Aldosterona e Ang-(1-7) modulam os níveis de transcrição gênica de MR e GR.....	<b>62</b>
<b>Figura 25:</b> Concentrações fisiológicas de aldosterona (10nmM) resultam em efeito sinérgico com a Ang-(1-7) na magnitude do transiente de cálcio.....	<b>64</b>

## LISTA DE TABELAS

**Tabela 1:** Seqüência dos *primers* utilizados na realização de PCRs em miócitos ventriculares. PRIMER 5'-3' Reverso 5'-3' ..... **39**

**Tabela 2:** Resumo de todas as alterações celulares observadas em miócitos ventriculares tratados com aldosterona e Ang-(1-7)..... **63**

## LISTA DE ABREVIATURAS

%FE= Fração de ejeção

%FE= Fração de encurtamento

(HAS = Hipertensão arterial sistólica),

( $I_{Ca,L}$ )= corrente de cálcio do tipo L ( $I_{Ca,L}$ )

[ $Ca^{2+}$ ]RS= cálcio do retículo sarcoplásmico

[ $Ca^{2+}$ ]<sub>i</sub> = cálcio intracelular

A260 = absorbância no comprimento de onda de 260 nanômetros

AC= adenilato ciclase

AEC = acoplamento excitação-contração

Akt = Proteína Kinase B

P-Akt = Proteína Kinase B fosforilada

AMPC = monofosfato cíclico de adenosina

Ang II= Angiotensina II

Ang-(1-7) =Angiotensina (1-7)

ANP = peptídeo natriurético atrial

AT1 = receptor de angiotensina II do tipo 1

BK = bradicinina

BSA = albumina de soro bovino (do inglês *Bovine Serum Albumin*)

$Ca^{2+}$  = íon cálcio

CaMKII = calmodulina quinase II

Camundongos NOS1<sup>-/-</sup> = camundongos deficientes de NOS1

Camundongos NOS2<sup>-/-</sup> = camundongos deficientes de NOS2

Camundongos NOS3<sup>-/-</sup> = camundongos deficientes de NOS3

CASQ2 = calsequestrina

CCT-L= canal de cálcio tipo L

cDNA = DNA complementar

CT = controle

DAF-FM =(4-amino-5-methylamino-2',7'-difluorofluorescein diacetat)

DMEM = meio de cultura (do inglês *Dulbecco's Modified Eagle's Medium*)

DNA= ácido desoxirribonucléico

DNase = deoxirribonuclease

DOCA= deoxicorticosterona

DPI = difenileneiodonium

ECA = Enzima Conversora de Angiotensina

ECA2 = Enzima Conversora de Angiotensina 2

EDTA-2Na = Ethylenediaminetetraacetic acid

eNOS = oxido nítrico sintase endotelial

ERN = espécies reativas de nitrogênio

EROS = Espécie Reativa de Óxigênio

ERK = Cinase regulada por sinal extracelular

P-ERK = Cinase regulada por sinal extracelular fosforilada

f = fator de diluição

F/F0 = fluorescência máxima/fluorescência mínima

FKBP12.6 = proteína de ligação FK506, 12.6

Fluo-4/AM = Flúor 4 aceto-metil-éster

GAPDH = gliceraldeído-3-fosfato-desidrogenase

Gi/0 = proteína G inibitória

GMPc= GMP cíclico

GPR30 = Receptor de estrógeno acoplado a proteína G-30

GR =receptores de glicocorticóide

H89 = também inibidor de PKA,

HRP = do inglês *horseradish peroxidase*

HSP = Heat Shock Protein

IgG = imunoglobulina G

KCl = cloreto de potássio

ICa = Canal de cálcio tipo L

*L-Dbu* (L-ArgNO<sub>2</sub>) (1μM), =bloqueador da oxido nitrico sintase neuronal.

L-NAME = N $\omega$ -Nitro-L-arginina metil éster hidrocloreto inibidor das óxido nítrico sintases

mAKAP = proteína cinase A de ancoragem

Mas = receptor de Angiotensina-(1-7)

Mas<sup>-/-</sup>KO = camundongo knockout para o receptor Mas

MgCl<sub>2</sub> = cloreto de magnésio

mifepristona = inibidor de glicocorticoíde (GR)

M-MLV RT = *Minus Moloney murine leukemia virus-reverse transcriptase*

MMPs = metaloproteinases da matriz extracelular

MR = receptor de mineralocorticóide

Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub> = ortovanadato de sódio

Na<sub>4</sub>P<sub>2</sub>O<sub>7</sub> x 10 H<sub>2</sub>O = pirofosfato de sódio hidratado.

NaCl = cloreto de sódio

NADPH = nicotinamida adenina dinucleotídeo 3-fosfato

NADPH oxidase = nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfatase-oxidase

NaF = fluoreto de sódio

NCX = trocador sódio-cálcio

nNOS = óxido nítrico sintase neuronal

ON = óxido nítrico

NOS = óxido nítrico sintase

NOS1 = óxido nítrico sintase neuronal

NOS2 = óxido nítrico sintase induzível

NOS3 = óxido nítrico sintase endotelial

O<sub>2</sub> = superóxido

ONOO<sup>-</sup> = peroxinitrito

PA = potencial de ação

PAS = pressão arterial sistólica

PBS = tampão fosfato-salino (do inglês *Phosphate buffered saline*)

PBS-T = tampão fosfato-salino com tween20 (do inglês *Phosphate buffered*

PCR = reação em cadeia de polimerase (do inglês *polymerase chain reaction*)

PFA = paraformaldeído

Pi=fosfato inorgânico

PI3K= fosfoinositol 3 quinase

PKA = proteína quinase A

PKC= proteína quinase C

PKC $\alpha$ =proteína quinase C  $\alpha$

PKG = proteína quinase G

pki = inibidor da PKA (10  $\mu$ M),

PLN = fosfolamban

PMSF = Phenylmethylsulphonyl fluoride

PP= proteína fosfatase

PP1=proteína fosfatase 1

PP2A= proteína fosfatase 2

P-PLN = fosfolamban fosforilada

Promoter  $\alpha$ -MHC= promoter de cadeia pesada de miosina

PVDF = membrana de Polyvinylidene fluoride

RNA = ácido ribonucléico

RNA<sub>m</sub> = RNA mensageiro

RNase = ribonuclease

RNS = espécies reativas de nitrogênio

RPM = rotações por minuto

RyR= receptor de rianodina

*saline tween-20*)

SD= Sprague-Dawley Hannover

SDS = dodecil sulfato de sódio

SDS-PAGE = gel de acrilamida (do inglês *sodium dodecyl (lauryl)*)

SERCA = ATPase-Ca<sup>2+</sup> do retículo sarcoplasmático

S-nitrosilação = nitrosilação de radicais tiol de resíduos de cisteína de proteínas

Spirolactona = inibidor de receptor de mineralocorticoide (MR)

SR: retículo sarcoplasmático

SRAA- Sistema Renina-Angiotensina Aldosterona

TG = transgênico

U.A = unidades arbitrárias

U.I = unidade internacional

VE= Ventrículo esquerdo

WT= Wild type = controle

XOR = xantina oxidoreductase

$\beta$ -MHC = cadeia pesada de miosina

TmT = Tropomiosina

TnC = Troponina C

TnI = Troponina I

P-TnI = Troponina I fosforilada

TnT= Troponina T

VSMC = Célula da musculatura lisa vascular



## RESUMO

Níveis séricos elevados de aldosterona têm sido associados com o desenvolvimento e progressão de doença cardíaca. Em contrapartida, a angiotensina (Ang)-(1-7) foi amplamente demonstrada possuir efeitos cardioprotectores, incluindo a atenuação da disfunção cardíaca induzida por ativação excessiva de receptores de mineralocorticóide *in vivo*, sugerindo assim possíveis interações entre estas duas moléculas. Neste trabalho, nós investigamos a possibilidade de um cross-talk entre aldosterona e Ang-(1-7) e as conseqüências funcionais deste para sinalização do cálcio ( $Ca^{2+}$ ) em miócitos ventriculares. Os efeitos a curto prazo da aldosterona sobre o transiente de  $Ca^{2+}$  foram avaliadas em cardiomiócitos incubados com a sonda fluorescente, sensível ao  $Ca^{2+}$ , Fluo-4/AM. Imagens obtidas através da microscopia confocal mostraram que a Ang-(1-7) isoladamente não foi capaz de alterar a magnitude ou a cinética de decaimento do transiente de  $Ca^{2+}$ , enquanto que a aldosterona isoladamente aumentou significativamente a amplitude do transiente  $Ca^{2+}$ . Interessantemente, a adição de Ang-(1-7) a miócitos tratados com aldosterona induziu um aumento ainda maior na magnitude da liberação de  $Ca^{2+}$ , sugerindo um efeito sinérgico entre estas moléculas. Ação da aldosterona na amplitude do transiente de  $Ca^{2+}$  foi mediada pela proteína quinase A, que age tanto modulando a corrente de  $Ca^{2+}$ , sendo relacionado a um aumento na densidade da corrente de  $Ca^{2+}$  (ICa), bem como ao aumento da fosforilação da fosfolambam na serina<sup>16</sup>. A fosfolambam é uma proteína que controla a atividade da SERCA. No entanto essas proteínas não foram afetadas pela presença da Ang-(1-7). Quando os cardiomiócitos foram expostos a aldosterona, o aumento da taxa de sparks de  $Ca^{2+}$  foi também avaliado. Enquanto a aldosterona levou a um aumento significativo na frequência de ocorrência das sparks de cálcio, a Ang-(1-7) previniu este efeito. Além disso, o L-NAME, inibidor da óxido nítrico sintase (NO), restaurou o efeito da aldosterona na taxa de sparks de  $Ca^{2+}$  em miócitos tratados com Ang-(1-7). Ademais, o L-NAME atenuou o efeito sinérgico da aldosterona e Ang-(1-7) na amplitude do transiente de  $Ca^{2+}$ . Também observou-se aumento nos níveis de espécies reativas de oxigênio (EROS) e alterações na expressão de mRNA para receptores de mineralocorticóide e glicocorticóide em resposta a aldosterona. A Ang-(1-7) foi capaz de antagonizar todos esses feitos. Em conjunto, estes resultados indicam que o NO desempenha um papel importante no cross-talk entre a aldosterona e a Ang-(1-7). Sendo que em cardiomiócitos, a produção de NO pela Ang-(1-7) ocorre tanto pela ativação da eNOS quanto pela ativação da nNOS. Nossos resultados trazem novas perspectivas na compreensão de como duas moléculas fisiologicamente importantes e com ações cardíacas

supostamente antagônicas apresentam um cross-talk sinérgico para amplificar a sinalização de  $\text{Ca}^{2+}$  em cardiomiócitos.

Palavras-chave: aldosterona, cálcio, miócitos, eletrofisiologia, angiotensina

## **ABSTRACT**

High serum levels of aldosterone have been linked to the development of cardiac disease. In contrast, angiotensin (Ang)-(1-7) was extensively shown to possess cardioprotective effects, including the attenuation of cardiac dysfunction induced by excessive mineralocorticoid activation in vivo, suggesting possible interactions between these two molecules. Here, we investigated whether there is cross-talk between aldosterone and Ang-(1-7) and its functional consequences for calcium ( $\text{Ca}^{2+}$ ) signaling in ventricular myocytes. Short-term effects of aldosterone on  $\text{Ca}^{2+}$  transient were assessed in Fluo-4/AM-loaded myocytes. Confocal images showed that Ang-(1-7) had no effect on  $\text{Ca}^{2+}$  transient parameters, whereas aldosterone increased the magnitude of the  $\text{Ca}^{2+}$  transient. Quite unexpectedly, addition of Ang-(1-7) to aldosterone-treated myocytes further enhanced the amplitude of the  $\text{Ca}^{2+}$  transient suggesting a synergistic effect of these molecules. Aldosterone action on the amplitude of the  $\text{Ca}^{2+}$  transient is mediated by protein kinase A, which acts modulating both the  $\text{I}_{\text{Ca}}$  current density, and phospholamban phosphorylation on serine16. Phospholamban is a key regulator of SERCA activity. Both changes were not altered by Ang-(1-7). When cardiomyocytes were exposed to aldosterone, increased  $\text{Ca}^{2+}$  spark rate was measured. Ang-(1-7) prevented this change. In addition, a NO synthase inhibitor, L-NAME, restored the effect of aldosterone on  $\text{Ca}^{2+}$  spark rate in Ang-(1-7)-treated myocytes and attenuated the synergistic effect of these two molecules in the  $\text{Ca}^{2+}$  transient. Increased reactive oxygen species, and altered mineralocorticoid and glucocorticoid receptor mRNA levels were also characteristic of aldosterone exposed myocytes. Ang-(1-7) antagonized all these changes. Furthermore, Ang-(1-7) effects on  $\text{Ca}^{2+}$  handling in aldosterone treated myocytes were mediated by nitric oxide. Ang-(1-7) effects on NO production correlated with increased eNOS and nNOS phosphorylation in cardiac myocytes. Taken together, these results indicate that NO plays an important role in Ang-(1-7) and aldosterone cross-talk. Our results bring new perspectives in the understanding of how two prominent molecules with supposedly antagonist cardiac actions cross-talk to synergistically amplify  $\text{Ca}^{2+}$  signals in cardiomyocytes.

Key Words: calcium, myocytes, electrophysiology, angiotensin

## 1. INTRODUÇÃO

A progressão da insuficiência cardíaca crônica é mediada em grande parte pela ativação excessiva de diferentes sistemas neuroendócrinos. Estudos experimentais e estudos clínicos associaram altos níveis de aldosterona circulante com o desenvolvimento e progressão de diferentes processos de doença cardiovascular (Park e cols., 2002; Swedberg e cols., 1990) sendo que altos níveis de aldosterona estão presentes em pacientes que apresentam insuficiência cardíaca (Swedberg e cols., 1990; Brown., 2003; Struthers., 2004). Em adição, a presença de ambos os receptores de mineralocorticóide (MR) (Delcayre e cols., 2000) e de glicocorticóide (GR) (Sheppard., 2003) já foi relatada no coração, dando suporte aos efeitos diretos da aldosterona na função do cardiomiócito tanto em condições normais quanto durante o remodelamento patológico.

Existem muitas evidências de que a modulação do influxo de  $Ca^{2+}$  desempenha um papel central na ação da aldosterona em cardiomiócitos. Foi demonstrado de maneira consistente que a aldosterona causa um aumento na amplitude da corrente de  $Ca^{2+}$  tipo-L (ICa) em cardiomiócitos ventriculares (Bénitah e cols., 1999), promovendo um aumento da fração de encurtamento celular (Wenzel e cols., 2010). Além disso, a aldosterona é também capaz de promover aumento da atividade dos receptores de rianodina (RyR) levando a uma liberação de  $Ca^{2+}$  anormal nos miócitos ventriculares (Gómez e cols., 2009).

Recentemente, foi demonstrado um *cross-talk* entre a sinalização dos receptores de mineralocorticóides e angiotensina II (Ang II) no coração (Di e cols., 2008), sendo os efeitos da ativação destas duas vias aditivos no coração. A Angiotensina (Ang)-(1-7) é um peptídeo ativo do sistema renina-angiotensina (RAS) que dentre outras ações contra regula os efeitos da Ang II (Gomes e cols., 2010; Keidar e cols., 2007; Mercure e cols., 2008). Grobe e cols (2006) demonstraram, anteriormente, que a infusão de Ang-(1-7) *in vivo* protege o coração contra os efeitos deletérios cardíacos da ativação de receptores de mineralocorticóides no modelo DOCA-sal. Achados semelhantes foram observados em ratos transgênicos que apresentam aumento dos níveis circulantes de Ang-(1-7) (Santiago e cols., 2010.).

Dados obtidos durante meu mestrado em 2010 (Almeida e cols., 2015) demonstraram que a Ang-(1-7) é capaz de proteger cardiomiócitos de ratos que foram submetidos a uma ativação excessiva dos receptores de mineralocorticóides através de alterações na sinalização de  $Ca^{2+}$  e de proteínas envolvidas no manejo do cálcio, indicando um possível *cross-talk* entre as vias de sinalização mediadas pela Ang-(1-7)

e pela ativação do receptor de mineralocorticóide. Buscando entender a convergência dessas duas vias e sua importância para dinâmica do  $\text{Ca}^{2+}$  em miócitos ventriculares decidimos investigar os efeitos agudos da aldosterona e Ang-(1-7) em cardiomiócitos isolados em condições de ativação de ambos receptores de mineralocorticóide (MR) e glicocorticóide (GR).

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 ALDOSTERONA

Aldosterona (Figura 1) foi isolada pela primeira vez em 1953, descrita como o último dos hormônios esteróides a ser reconhecido, Simpson e cols. (1954). A descoberta da aldosterona há mais de cinco décadas, levou às pesquisas que produziram uma análise extensiva das ações biológicas mediadas por esta molécula. A história da descoberta dos mecanismos de regulação e de ação da aldosterona, entre 1960 e 1970, ofereceu uma visão única do nascimento da biologia molecular e seu consequente impacto no campo de pesquisa genômica nas décadas de 1980 e 1990, e no século XXI, Williams e cols. (2003).

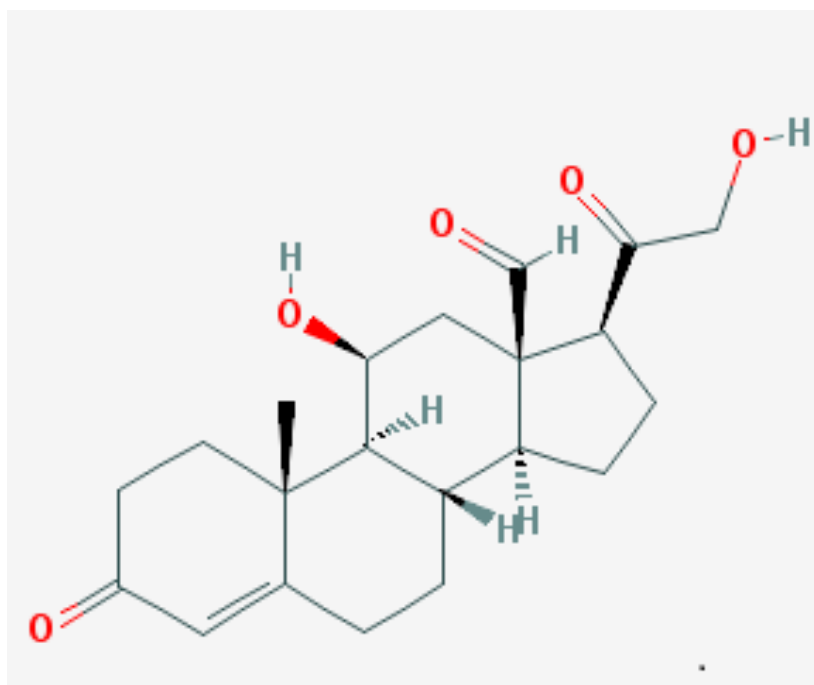


Figura 1: Fórmula química estrutural da aldosterona. Fonte: NCBI/Pubchem.

A aldosterona é o mais importante hormônio mineralocorticóide. Em mamíferos é sintetizado a partir do colesterol, Dooley e cols. (2011) na zona glomerulosa do córtex da supra-renal e exerce papel essencial na homeostase de água e eletrólitos. Sua fórmula e peso molecular são  $C_{21}H_{28}O_5$  e 360.4 [g/mol], respectivamente. Esse hormônio exerce os seus efeitos nos tecidos epiteliais dos rins, do cólon e em tecidos não-epiteliais, tais como o cérebro e o sistema cardiovascular, Dooley e cols. (2011), regulando a reabsorção de solutos em epitélios, como no cólon distal e nos rins, Marver e cols. (1983).

O precursor da aldosterona, o colesterol, é um lipídio que está presente no organismo animal, tanto nos tecidos como nas lipoproteínas plasmáticas, seja sob a forma livre ou combinada (com ácidos graxos), como o éster de colesterol, Brody (1993). Sua importância fisiológica reside no amplo papel que desempenha no organismo animal como precursor de sais biliares, de hormônios glicocorticóides e mineralocorticóides, na síntese de hormônios sexuais, na formação de vitamina D e principalmente, como elemento estrutural nas membranas celulares, Brody (1993). O colesterol está presente em diversos tipos de alimentos de origem animal, podendo ser ingerido na dieta, além de ser sintetizado no fígado a partir de moléculas mais simples, Nelson e Cox (2006).

No organismo, a síntese da aldosterona a partir do colesterol (Fig.2) é realizada por uma série de reações enzimáticas, coordenadas e específicas. Primeiramente, o colesterol atravessa a membrana mitocondrial onde a primeira enzima da via esteroidogênica está situada. Após a translocação para a mitocôndria, o colesterol é convertido em aldosterona por uma série de reações enzimáticas catalisadas por desidrogenases e oxidases de função mista. Muitas dessas enzimas pertencentes à superfamília do citocromo P450, requerem um sistema de coenzima acoplado (adrenodoxina / adrenodoxina redutase), que transferem elétrons para a enzima P450, atuando como redutores equivalentes para a reação de hidroxilação, Lambeth e cols. (1982).

A primeira reação é a conversão do colesterol em pregnenolona, catalisada pela clivagem da cadeia lateral P450 da enzima (CYP11A1), codificada pelo gene CYP11A1 que se encontra no cromossomo humano 15. Esta enzima catalisa três reações, que antes da descoberta do gene STAR era foram considerada limitante: a 20 $\alpha$ -hidroxilação, 22-hidroxilação e quebra da ligação entre o C-20 e C-22 para produzir pregnenolona e ácido isocaproico, Lieberman e Lin (2001); Connell e Davies (2005).

A pregnenolona é liberada no citosol e é convertida em progesterona por desidrogenação do grupo 3 $\beta$ -hidroxila e isomerização da ligação dupla em C5 para  $\Delta^4$  pela 3 $\beta$ -hidroxiesteróides desidrogenase (3 $\beta$ -HSD), que está localizada na membrana do retículo endoplasmático liso. Duas isoenzimas da 3 $\beta$ -HSD foram identificadas em humanos, Mason (1993); Simard e cols. (1993). HSD3B1 e HSD3B2 são codificados pelos genes 3 $\beta$ -HSD1 e 3 $\beta$ -HSD2, respectivamente, que se encontram em tandem no cromossomo 1 em humanos, Berube e cols. (1989); Lachance e cols. (1991) enzima conversora de angiotensina.

A progesterona sofre 21-hidroxilação pela CYP21A, enzima localizada na superfície citoplasmática do retículo endoplasmático liso, produzindo 11-

deoxicorticosterona, Shinzawa e cols. (1988). O gene que codifica a enzima CYP21A foi mapeado no cromossomo humano 6 e é adjacente a um pseudogene, CYP21P, White e cols. (1986). A conversão de 11-deoxicorticosterona para aldosterona envolve três reações consecutivas: 11 $\beta$ -Hidroxilação da 11-deoxicorticosterona para formar corticosterona, 18-hidroxilação para produzir 18-hydroxycorticosterone (18-OH-B) e, finalmente, 18-methyloxidation à aldosterona. Estas reações são catalisadas pela aldosterona sintase, que se localiza no interior da membrana mitocondrial e é codificada pelo gene CYP11B2, gene este expresso na zona glomerulosa.

A aldosterona sintase é altamente homóloga (cerca de 90%) para 11 $\beta$ -hidroxilase (o produto do gene CYP11B1), que catalisa a conversão de 11-desoxicortisol para o glicocorticóide cortisol. Os dois genes estão localizados em tandem em cromossomo humano, Mornet e cols. (1989); Connell e Davies (2005).



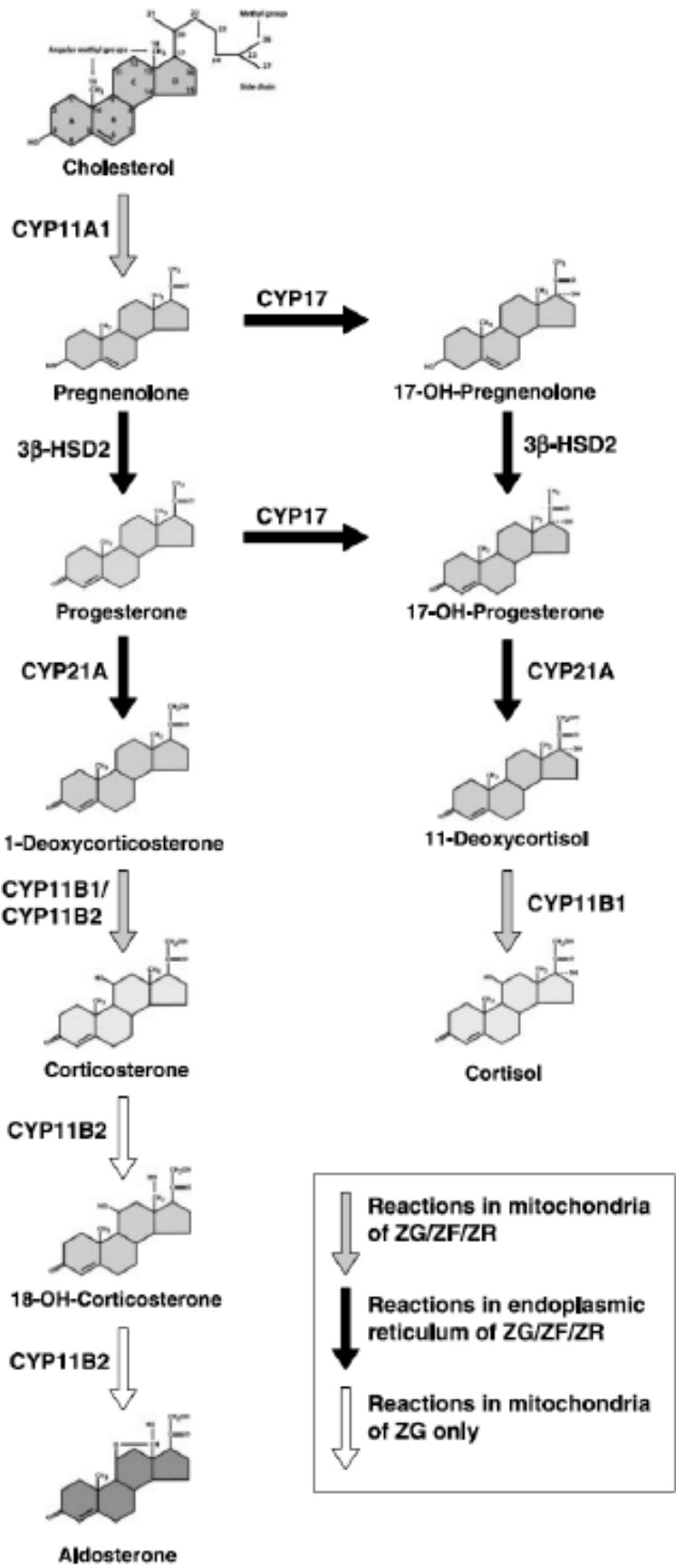


Figura 2: Biossíntese de aldosterona e cortisol no córtex da adrenal humana. (ZG: zona glomerulosa; ZF: zona fasciculada; ZR: zona reticular. Connell e Davies (2005).

O hormônio aldosterona está inserido em uma importante cascata de sinalização de proteção dos rins, que se inicia com a queda de pressão arterial, o sistema renina-angiotensina-aldosterona (SRAA). O SRAA é um sistema neuroendócrino complexo, responsável pela modulação do equilíbrio hidroeletrólítico e regulação da pressão arterial. Através das suas múltiplas interações, esse sistema contribui para a proteção do tecido endotelial, cardíaco, cerebral e renal. Adicionalmente, ele regula ainda a resposta do endotélio à inflamação e lesão. A sua ativação crônica induz hipertensão e perpetuação de uma cascata pró-inflamatória, pró-trombótica e aterogênica, e é à base da lesão de vários órgãos-alvo (coração, cérebro, rim, endotélio). Dessa forma, o estudo do RAAS constitui um alvo terapêutico importante nestas situações, Giestas e cols. (2010).

Em 1898, Robert Tigerstedt e Per Bergman publicaram um estudo no qual verificaram um aumento da pressão arterial ao injetar extratos de córtex renal em coelhos e, sugeriram que este aumento tensional era devido a uma proteína solúvel produzida pelos rins que designaram de renina. Levou mais meio século até que fossem identificados os demais componentes deste complexo e articulado sistema. Este modelo tem servido de base à compreensão da fisiopatologia da hipertensão arterial.

Os principais elementos da cascata do SRAA englobam o angiotensinogênio, a renina, a angiotensina I (Ang I), a enzima conversora de angiotensina (ECA) e a angiotensina II (Ang II). O angiotensinogênio consiste numa  $\alpha$ -2 globulina de 411 aminoácidos secretada pelo fígado e cuja produção é estimulada em resposta aos glicocorticoides, estrógenos e citocinas inflamatórias (interleucina-1, fator de necrose tumoral), Morgan e cols. (1996). O angiotensinogênio se encontra no plasma como um peptídeo biologicamente inativo, servindo de substrato à renina.

A renina regula a etapa limitante do SRAA ao clivar a porção N-terminal do angiotensinogênio para formar o decapeptídeo inativo Ang I, Argañaraz e cols. (2008). Ela é sintetizada por células justaglomerulares como um pré-pró-hormônio. A renina ativa é formada a partir da remoção proteolítica de um segmento peptídico na região N-terminal da pró-renina, o precursor da renina.

A secreção da renina ativa é regulada principalmente por alterações na

concentração de cloreto de sódio (NaCl) detectadas pela mácula densa do tubo distal (que juntamente com as células justaglomerulares formam o aparelho justaglomerular); um mecanismo barorreceptor renal na arteríola aferente sensível a alterações da pressão de perfusão renal; estimulação nervosa simpática via receptores adrenérgicos  $\beta$ -1; e feedback negativo por ação direta da Ang I nas células justaglomerulares, Brown (2006). Além disso, a secreção de renina também é estimulada por reduções da pressão de perfusão ou do conteúdo de NaCl e por aumento da atividade simpática.

A enzima conversora de angiotensina (ECA), descrita em 1956, é uma dipeptidil-carboxilase que ativa um vasoconstritor potente ao converter a Ang I (dez aminoácidos) em Ang II (oito aminoácidos). Ela exerce ainda, um efeito vasoconstritor ao inativar o sistema das cininas (bradicinina, substância P), Carey e Siragy (2003) e está presente no endotélio vascular sistêmico (60%), sendo mais abundante no endotélio vascular pulmonar (40%). A Ang II circula no plasma como um octapeptídeo [Ang. (1-8)] biologicamente ativo, Carey e Siragy (2003). A ECA é originada principalmente no pulmão, mas também pode ser produzida localmente em vários tecidos (rins, coração, cérebro, adrenais e vasos). O seu tempo de meia vida é curto (2 min.) devido à rápida clivagem em Ang III e IV, através da remoção de aminoácidos da porção N-terminal pelas amino peptidases, Giestas (2010).

Existe ainda na cascata da SRAA um heptapeptídeo, a Ang-(1-7), formado a partir da Ang I ou da clivagem da porção C-terminal da Ang II, por ação de carboxipeptidases, uma das quais, possui homologia estrutural com a ECA, designando-se ECA2. Ao contrário da ECA, a ECA2 leva à formação de peptídeo, com efeito, predominantemente vasodilatador, ou seja, a Ang-(1-7), a qual atua em receptor específico (receptor Mas), exercendo ação vasodilatadora e cardioprotetora, Reudelhuber (2005).

Quando o SRAA entra em ação, estimula a secreção de renina, que é sintetizada pelas células justaglomerulares da arteríola aferente do rim, em resposta a uma diminuição no volume intravascular detectado pelos barorreceptores (mediado pela ativação de  $\beta$ -adrenoceptor) e por uma redução da concentração de sódio na mácula densa. A renina catalisa a hidrólise de angiotensinogênio em Ang I que depois é convertida em Ang II pela enzima conversora de angiotensina (ECA), presente nos

pulmões e tecido vascular. Ang II atua no músculo liso vascular para causar vasoconstrição, e na zona glomerulosa adrenal para estimular a secreção de aldosterona. A resposta adrenal à Ang II ocorre em poucos minutos, o que mostra que nenhuma síntese proteica é necessária, Alves (2007).

A aldosterona pode ser uma das molécula efetora final do SRAA e atua nas células epiteliais do néfron distal, Alves (2007) e do cólon, promovendo a reabsorção de sódio e excreção de potássio. A água segue o movimento do sódio, via osmose, estabilizando o volume plasmático e conseqüentemente a pressão arterial, Fernandes-Rosa e Antonini (2006); Giestas e cols. (2010).

Apesar de trazer inúmeros benefícios ao organismo, a aldosterona em excesso pode por sua vez desencadear processos que levem ao desenvolvimeto da hipertensão, a qual é conhecida por ter efeitos adversos no sistema cardiovascular, Balakumar e cols. (2010). Ademais existem evidências de que a aldosterona exerça efeitos diretos sobre o sistema cardiovascular, independentes do aumento de pressão sanguínea, Stowasser (2005).

## **2.2 CONSEQUÊNCIAS DESENCADEADAS PELO EXCESSO DE ALDOSTERONA**

A ação do hormônio aldosterona sobre receptores mineralocorticóides nos rins causa retenção de sódio e subseqüente aumento no volume sanguíneo.

Uma ativação anormal do sistema renina-angiotensina-aldosterona está diretamente correlacionada com a incidência e extensão de danos em órgãos-alvo como o coração conduzindo a hipertrofia ventricular esquerda e insuficiência cardíaca congestiva. Além dos efeitos conhecidos da aldosterona na hipertrofia de cardiomiócitos, esta também pode levar a apoptose, e fibrose que também caracterizam o remodelamento cardíaco em resposta a este hormônio. (Dooley e cols. (2011).

Desta forma, os efeitos prejudiciais da aldosterona sobre o coração incluem a indução de inflamação vascular e lesão, hipertrofia e fibrose do miocárdio, arritmia ventricular e disfunção cardíaca, Rossier e cols. (2010). Estudos clínicos e experimentais têm demonstrado que o bloqueio do RAAS com inibidores de enzimas conversoras de angiotensina (ACE), bloqueadores do receptor de angiotensina II do

tipo 1 (AT1) ou antagonistas de receptores mineralocorticóides (MR) promovem substancial proteção cardiovascular, Nagata e cols. (2002). O eixo aldosterona receptor mineralocorticóide coloca-se, assim, como possível alvo terapêutico, independente do eixo renina-angiotensina-aldosterona. Estas observações têm implicações terapêuticas, dado o fato de que o MR se torna um dos principais alvos de medicamentos farmacológicos na prática clínica para prevenir a descompensação da função cardíaca e evolução para insuficiência cardíaca e arritmias letais, Rossier e cols. (2010).

## **2.3 MECANISMOS DE AÇÃO INTRACELULAR DA ALDOSTERONA**

### **2.3.1 Ação genômica da aldosterona**

A aldosterona aumenta a biossíntese e/ou modula a atividade de inúmeros transportadores de membrana e outras proteínas em células renais, ação esta, também identificada em cardiomiócitos, Korichneva e cols. (1995); Kuster e cols. (2005). Esse hormônio atua em seus órgãos-alvo através da ligação a seus receptores MR, localizados no citoplasma próximo a região externa da membrana nuclear, Yang e cols. (2010). Uma vez ativado, o então formado, complexo receptor-aldosterona transloca-se para o núcleo, ligando-se a regiões responsivas cognatas do DNA, essa ligação entre aldosterona e receptor de MR apresenta respostas similares as desencadeadas pelos glicocorticóides, progesterona e hormônios andrógenos quando ligados aos seus respectivos receptores. Funder e cols. (1988); Lombès e Binart (1993); Yang e cols.(2010). Após a ligação ao DNA, o complexo receptor-hormônio estimula a transcrição de genes alvos que incluem os que codificam para canais de sódio sensíveis a amilorida (ENaC), Na/K-ATPase, SGK (quinase 1 induzível por glicocorticoide) e quinases. Todas as proteínas sintetizadas acima são fatores chave no controle da reabsorção de sódio no organismo, Bernard (2009). Este mecanismo é muito similar ao observado em resposta a outros hormônios esteróides, Bernard (2009).

Os principais trabalhos na área enfocam a ação da aldosterona nos rins, porém são crescentes os estudos sobre sua ação no coração, na qual a ação da aldosterona está vinculada a atividade de vários fatores de transcrição pró-hipertrofos, Heineke e cols. (2006). Talvez o que melhor caracterize a expressão gênica hipertrofica seja o

fator GATA 4, que regula o desenvolvimento e diferenciação da expressão gênica cardíaca, Molkenin (2000). O GATA 4 durante o estresse fisiopatológico medeia a indução de genes que estão envolvidos na hipertrofia cardíaca, Akazawa (2003).

Em células vasculares, alguns genes alvos da aldosterona foram identificados. Estes incluem no endotélio, o gene que codifica para a óxido nítrico (ON) sintase (NOS 3), Cachoeiro e cols. (2008), e nas células musculares lisas BKCa, um canal de potássio repolarizante. Este canal está associado a uma diminuição da resposta celular de acetilcolina e, em última análise leva a uma diminuição da resposta coronária, Ambroisini e cols. (2007).

Em 1964 evidências para a presença de determinados receptores de corticosteróides foram mostradas em células epiteliais por Porter e Edelman (1964). Posteriormente, receptores tipo I, e tipo II de corticosteróides foram descritos e identificados como mineralocorticóide (MR) e receptor glicocorticóide (GR), Marver e cols. (1974). O receptor mineralocorticóide (MR) é um membro da superfamília de receptores nucleares, Yang e cols. (2010), e foi caracterizado como um dos principais reguladores da reabsorção de sódio no rim, Funder e cols. (1972). Quinze anos mais tarde, o cDNA do MR em humanos foi clonado e foi construída uma biblioteca de cDNA de rim, Arriza e cols. (1987). No final de 1990 foram identificados co-reguladores de transcrição do MR nos genes alvo da aldosterona. Este receptor é agora reconhecido como um fator de transcrição essencial envolvido em muitos processos fisiológicos e patológicos, O'Malley (2008).

O gene que codifica o MR humano é o NR3C2 e está localizado no cromossomo 4, na região q31.1 e abrange cerca de 450 Kb, Morrison e cols. (1990); Zennaro (1995). Este gene é composto por dez éxons, sendo que os dois primeiros éxons, 1 $\alpha$  e 1 $\beta$ , são traduzidos, e os oito éxons seguintes, codificam a proteína inteira do MR com 984 aminoácidos. Como todos os membros da superfamília de receptores nucleares, o MR tem três grandes domínios funcionais: um domínio N-terminal, seguido por um domínio central de ligação ao DNA, e uma região da dobradiça vinculando-os a um domínio ligante C-terminal, Pascual-Le Tallec e cols. (2005).

A resposta à via genômica da aldosterona envolve dimerização do receptor mineralocorticóide, dissociação das proteínas de choque térmico (pertencentes a uma

classe de chaperonas moleculares, que são proteínas responsáveis pelo correto dobramento de outras proteínas sintetizadas e pela prevenção da agregação protéica. Elas são altamente conservadas sugerindo uma grande importância evolutiva) do MR, Yang e cols. (2010); Dooley e cols. (2011), translocação do complexo aldosterona-MR para o núcleo e a concomitante regulação da expressão gênica. A ação conhecida da aldosterona, após a ligação ao receptor MR, leva algumas horas para se completar, uma vez que envolve mecanismos gênicos e subsequente síntese protéica. Fernandes-Rosa e Antonini (2006). A ativação patológica do MR causa fibrose e insuficiência cardíaca, mas a utilização clínica de alguns antagonistas do MR é limitada pelos efeitos colaterais renais de hiperpotassemia, Yang e cols. (2010).

Recentemente vêm surgindo novas descobertas sobre as ações da aldosterona, as quais não se mostram restritas aos alvos clássicos de sua ação. Órgãos como o coração, vasos e sistema nervoso central são apontados como novos alvos da ação da aldosterona. A localização dos receptores MR já foi descrita no tecido cardíaco, Funder e cols. (1988); Lombès e cols. (1992) e na vasculatura, Takeda e cols.(1995). Isto indica uma gama de novos possíveis efeitos da aldosterona mediados pela ativação dos receptores mineralocorticóides nestes tecidos.

A ação genômica da aldosterona resulta de um importante período latente (de 30 a 60 minutos) prévio ao início das mudanças na atividade celular; e inibidores da transcrição (actinomicina D), da tradução (cicloheximida), da translocação do receptor esteróide e de antagonistas do MR abolem as ações genômicas. (Booth e cols., 2002). A ação genômica consiste em duas fases: precoce (de uma a seis horas) e tardia (> seis horas). A fase precoce é mediada exclusivamente pelos efeitos primários. Os efeitos primários consistem em alterações na expressão gênica que promovem ativação de canais iônicos e de proteínas de sinalização, que por sua vez, induzem as proteínas que transportam eletrólitos (efeitos secundários). A fase tardia é resultante dos efeitos primários e secundários da expressão gênica. (Booth e cols. 2002)

### **2.3.2 Ação não genômica da aldosterona**

Curiosamente, estudos recentes nesta área têm focado nos efeitos diretos da aldosterona, ou seja, ações não genômicas, e sua participação na inflamação e fibrose

em doenças cardiovasculares Williams e cols. (2003); Giestas e cols. (2010); Rao (2010).

Estudos recentes demonstraram que a aldosterona possui um grande número de atividades fisiológicas mediadas por mecanismos que não envolvem a translocação de seu receptor ao núcleo. Estes efeitos não são explicados pelo mecanismo clássico descrito para receptores MR que atuam sobre o genoma e por isso são denominados também de não genômicos, Grossmann e cols. (2008).

Os efeitos não genômicos da aldosterona foram postulados pela primeira vez por Moura e Worcel em meados de 1984. Os primeiros estudos celulares demonstraram maior troca de sódio em eritrócitos caninos, descartando um mecanismo genômico, pois este tipo celular não possui núcleo, Spach e Streeten (1964). Estes estudos foram seguidos de investigações sobre o transporte de eletrólitos mediados por aldosterona em leucócitos mononucleares humanos, Wehling e cols. (1989); Christ e cols. (1993). Os efeitos não genômicos da aldosterona são mediados por eventos de sinalização, descritos como elevação de  $Ca^{2+}$  intracelular, IP3, DAG e PKC, PLC e AMPc, Christ e cols. (1993, 1995b, 1999); Wehling e cols. (1995) A ativação dessas vias pode ocorrer não só em células renais, mas também em células da musculatura vascular lisa e células endoteliais, Christ e cols. (1995a); Wehling e cols. (1994, 1995).

As respostas rápidas à aldosterona, que em geral ocorrem dentro de segundos a minutos, não envolvem a transcrição de genes ou tradução de proteínas, mas são capazes de modular, direta ou indiretamente as respostas da via genômica, Grossmann e Gekle (2009). Estes efeitos são insensíveis aos inibidores de transcrição (actinomicina D) e de síntese protéica (cicloexemida) e apresentam um perfil farmacológico diferenciado com relação ao agonismo e antagonismo, Losel e cols. (2003).

No entanto, não se sabia se os sítios de ligação para aldosterona na via direta são modificações do receptor clássico de mineralocorticóides (MR) ou se eles representam um receptor ainda não conhecido. Estudos com camundongos nocautes para os receptores MR demonstraram que a ação rápida da aldosterona não apenas persiste nesse modelo, como é ainda mais pronunciada, quando comparada ao tipo



selvagem, Haseroth e cols. (1999). Desta forma este estudo mostrou claramente que estas respostas rápidas envolvem um receptor distinto do clássico MR, Haseroth e cols. (1999). Entretanto, ainda existe grande controvérsia com relação ao receptor responsável pelos efeitos não genômicos da aldosterona. Le Moellic (2004) utilizando a aldosterona acoplada a BSA demonstrou que nestas condições, os efeitos rápidos da aldosterona eram observados, favorecendo a ideia da atuação de um receptor de membrana, pois quando a aldosterona se encontra ligada a moléculas grandes ela é incapaz de atravessar a membrana rapidamente. Receptores semelhantes têm sido propostos para outros hormônios esteróides, Orshal e Khalil (2004); Zhu e cols. (2003).

Os efeitos não genômicos mediados pela aldosterona estão associados à ativação da fosfolipase C (PLC) com subsequente hidrólise de fosfolípidios de membrana. Esta última reação libera DAG e IP<sub>3</sub>, que por sua vez ativam a proteína quinase C (PKC) e liberam Ca<sup>2+</sup> do retículo, respectivamente. O Ca<sup>2+</sup> já é conhecido como um mensageiro crucial na sinalização hipertrófica, Frey e Olson (2003). Esta ação foi demonstrada em células da musculatura lisa vascular e em células endoteliais, Falkenstein e cols. (2000); Wehling e cols. (1995). O aumento de Ca<sup>2+</sup> leva à ativação de calcineurina, uma fosfatase também conhecida por PP2B, causando morte celular por apoptose, Mano e cols. (2004).

A aldosterona também causa fosforilação de várias moléculas sinalizadoras intracelulares, incluindo c-Src, Callera e cols. (2005), MAP quinase, quinase regulada por sinal externo 1/2 (ERK1/2), c-Jun quinase (JNK) e p38, Callera e cols. (2005); Krug e cols. (2003); Mazak e cols. (2004); Nishiyama e cols. (2005), além de receptores como o do fator de crescimento epidermal (EGFr), Krug e cols. (2006). A ativação da MAP quinase parece estar envolvida na promoção da proliferação de células da musculatura lisa vascular (VSMC) e da hipertrofia relacionada com o remodelamento vascular que ocorre durante a hipertensão. (Touyz, 2003).

Além disso, a aldosterona inibe a ação da enzima óxido nítrico sintase induzível (iNOS) que pode, virtualmente, contribuir para todos os efeitos cardíacos produzidos pela aldosterona, Chun e cols. (2003).

#### **2.4 PEPTÍDEOS DO SRA E A SINALIZAÇÃO DA ALDOSTERONA**

Vários estudos vêm demonstrando um possível *cross-talk* entre os efeitos relacionados às vias genômicas e não-genômicas da aldosterona e componentes do SRAA. Em particular, o *cross-talk* entre as vias reguladas pela aldosterona e pela angiotensina II podem potencializar a lesão de órgãos induzida pelo aumento da estimulação do SRAA. (Lemarie e cols., 2008; Jaffe e cols., 2005). Tem sido sugerido que esta relação entre essas vias depende do receptor não dependente de tirosina quinase c-Src (proteínas proto-oncogênicas pp60), e em receptores de tirosina quinases, EGFR (receptor do fator de crescimento epidérmico) e PDGFR (receptor do fator de crescimento derivado de plaquetas). As ações destes receptores resultam na ativação de MAP quinases (proteína-quinases ativadas por mitógenos) e crescimento celular, migração e inflamação. (Rautureau e cols., 2011).

Esse *cross-talk* entre aldosterona e angiotensina II foi reforçado pelo estudo de Harada e cols., (2001), onde foi demonstrado em cardiomiócitos de ratos, que elevados níveis de aldosterona estão relacionados com aumento na expressão da enzima conversora de angiotensina (ECA). Posteriormente, elevados níveis de angiotensina II, por sua vez estimularam a síntese de aldosterona. Nos seres humanos, a aldosterona regula positivamente os receptores da angiotensina II em células musculares lisas (VSMC) e potencializa o efeito vasoconstritor da angiotensina II em artérias coronárias (Chai e cols., 2005). Ademais, a interação entre aldosterona e seu receptor (MR) faz aumentar a ativação da NADPH-oxidase no sistema cardiovascular (Stas e cols., 2007). Por conseguinte, o antagonismo do receptor de MR diminui a expressão do receptor de angiotensina II, ECA, e endotelina-1 no miocárdio não-infartado (Fraccarollo e cols., 2005).

Sabe-se que a Angiotensina Ang-(1-7) é um peptídeo ativo do sistema renina-angiotensina (RAS), que dentre outras ações contrarregula os efeitos da Ang-II (Gomes e cols., 2010; Keidar e cols., 2007; Mercure e cols., 2008). Grobe e cols (2006) demonstraram, anteriormente, que a infusão de Ang-(1-7) *in vivo* protege o coração contra os efeitos deletérios cardíacos da ativação de receptores de mineralocorticoides no modelo DOCA-sal. Achados semelhantes foram observados em ratos transgênicos que apresentam aumento dos níveis circulantes de Ang-(1-7) (Santiago e cols., 2010.).

Dados obtidos durante meu mestrado em 2010 (Almeida e cols., 2015) demonstraram que a Ang-(1-7) é capaz de proteger o coração de ratos submetidos à ativação excessiva dos receptores de mineralocorticoides, através de alterações na sinalização de  $Ca^{2+}$  e da expressão de proteínas envolvidas no manejo do cálcio.

Esses dados sugerem um possível *cross-talk* entre as vias de sinalização mediadas pela Ang-(1-7) e pela ativação do receptor de mineralocorticóide.

## 2.5 EFEITOS DIRETOS DA ALDOSTERONA NO CARDIOMIÓCITO

O trabalho mecânico desempenhado pelo coração é regido por um fino controle da concentração de cálcio intracelular ( $[Ca]_i$ ), o qual varia espaço-temporalmente de forma regulada ao longo do processo da contração. O mecanismo básico de ativação dessa maquinaria contrátil ocorre, inicialmente, pela ativação dos canais iônicos presentes na membrana, principalmente devido à ativação dos canais sensíveis a voltagem, sendo que a  $ICa,L$  permite de forma indireta a elevação da concentração citoplasmática de  $Ca^{2+}$ , sendo este o responsável pela ativação da contração celular (Bers., 2001).

No músculo cardíaco, íons  $Ca^{2+}$  contribuem diretamente para o acoplamento da atividade elétrica a geração da força contrátil, num processo conhecido como acoplamento excitação-contração (AEC) (Bers., 2002; Bers., 2001). As funções contrátil e estrutural do cardiomiócito são moduladas pela ativação de cascatas de sinalização envolvendo cinases e fosfatases que participam na regulação de genes envolvidos no remodelamento patológico cardíaco. Essas alterações podem ser desencadeadas por estímulos mecânicos e neuro-hormonais, tais como, estiramento do cardiomiócito, adrenalina, noradrenalina, angiotensina II e aldosterona (Dorn & Force., 2005). Por exemplo, durante a insuficiência cardíaca ocorrem alterações significativas na regulação da sinalização  $Ca^{2+}$  no cardiomiócito, e essas alterações são críticas em estabelecer tanto uma disfunção contrátil, quanto certas arritmias. (Berridge, 2006).

O acoplamento excitação-contração (AEC) inicia-se através da propagação de um PA cardíaco que promove a despolarização da membrana plasmática e como já mencionada, ativa os canais para  $Ca^{2+}$  dependentes de voltagem. A corrente de  $Ca^{2+}$  do tipo L ( $ICa,L$ ), presente nos miócitos ventriculares, é caracterizada por uma rápida ativação e por uma cinética de decaimento (inativação) muito lenta. A inativação da corrente de  $Ca^{2+}$  do tipo L é tanto dependente da concentração de cálcio quanto da voltagem. A inativação dependente de  $Ca^{2+}$  é considerada como o mecanismo principal de inativação da  $ICa,L$ , efeito este mediado pela CaM (calmodulina). Perrier e cols., (2005) demonstraram que a administração de aldosterona em cardiomiócitos de ratos provocou o aumento da corrente de  $Ca^{2+}$  no canal de  $Ca^{2+}$  tipo-L, indicando um mecanismo pelo qual esse hormônio pode interferir na atividade cardíaca.

Para manter a homeostase do  $\text{Ca}^{2+}$  e permitir o relaxamento do músculo cardíaco, a concentração de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular, que aumentou em resposta ao potencial de ação, deve retornar ao valor basal ( $0.1\mu\text{M}$ ), existente antes do PA. Dois dos principais mecanismos de extrusão do  $\text{Ca}^{2+}$  do citosol, são a  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase do retículo sarcoplasmático (SERCA), e o trocador  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  (NCX) (Bers., 2002; Philipson e cols., 2000). Embora a remoção do  $\text{Ca}^{2+}$  via a  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase do retículo sarcoplasmático seja o mecanismo predominante de redução do  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  citosólico no miócito cardíaco, existem diferenças significativas no que concerne a contribuição específica do trocador  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  versus a  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase, de acordo com a espécie utilizada, a região do coração, o estágio de desenvolvimento, e estado patofisiológico do coração (Piacentino e cols., 2003; Pogwizd e cols., 2001). O  $\text{Ca}^{2+}$  ativador da contração no músculo cardíaco origina-se de duas fontes:  $\text{Ca}^{2+}$  extracelular que entra por canais para cálcio dependentes de voltagem e o  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular proveniente do retículo sarcoplasmático, sendo este último responsável por cerca de 80% do  $\text{Ca}^{2+}$  total liberado no citosol.

O tratamento agudo com aldosterona induz também a ativação moderada da PKA, o que leva a um aumento do transiente  $\text{Ca}^{2+}$ , possivelmente através de um aumento da corrente de  $\text{Ca}^{2+}$  tipo L (ICa). Benitah e cols., (1999) demonstraram que a aldosterona aumenta a (ICa)(Benitah e cols., 1999; Perrier e cols., 2005) e além disso parece interferir no encurtamento dos miócitos ventriculares (Wenzel e cols., 2010). Outros estudos demonstraram que aumento nos níveis de aldosterona promovem incrementos na concentração de cAMP em células do músculo liso vascular (Christ e cols., 1999) e dutos coletores medulares internos (Shedder e cols., 2002).

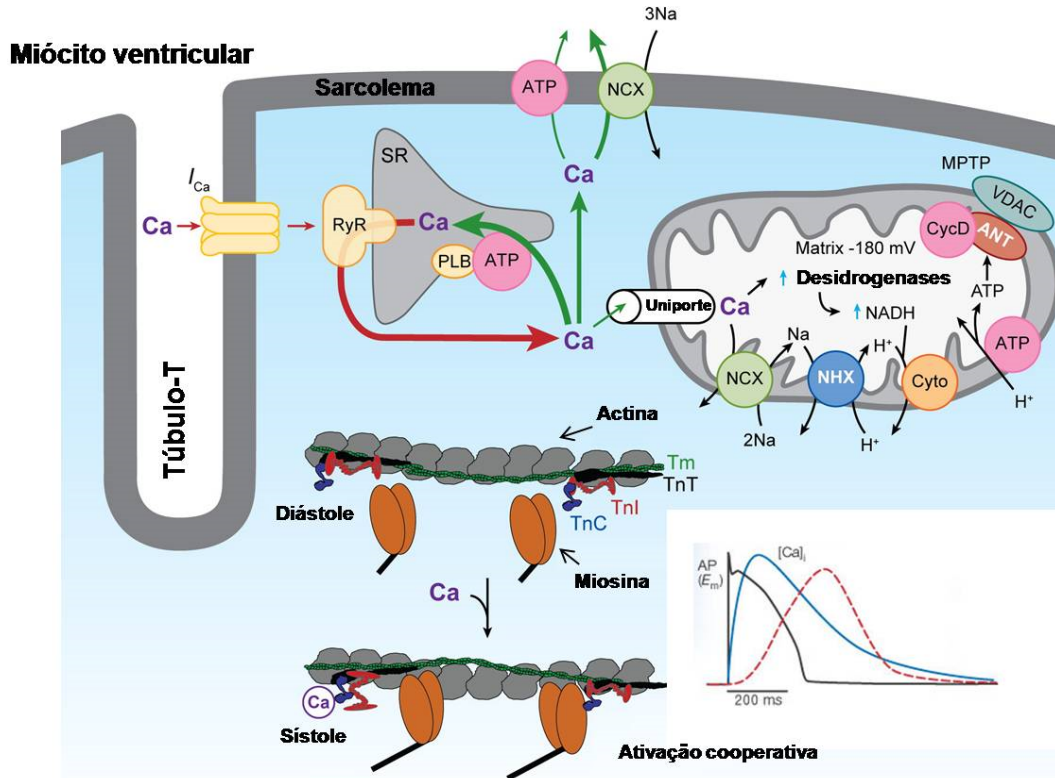
A PKA tem como um de seus alvos de ação, a fosfolamban (PLN), uma proteína que regula a atividade da SERCA 2A por aumentar sua fosforilação no sítio da serina<sup>16</sup> (Ser<sup>16</sup>). A defosforilação da PLN inibe a atividade da SERCA 2A, ao passo que a sua fosforilação reverte esta inibição, aumentando assim a recaptação de  $\text{Ca}^{2+}$  para o retículo sarcoplasmático (RS). Aqui vale ressaltar, que o aumento da concentração de cálcio no retículo sarcoplasmático pode explicar o aumento da magnitude do transiente de cálcio. A fosfolamban também pode ser fosforilada no resíduo Thr<sup>17</sup> pela CaMKII, o que acarreta em uma redução no Km da bomba pelo  $\text{Ca}^{2+}$  (Simmerman e cols., 1986). Outro transportador que participa da redução da  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  no citosol é o trocador  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ , promovendo a troca de 3 íons  $\text{Na}^+$  por 1 íon  $\text{Ca}^{2+}$ . O trocador  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ , uma bomba dependente de ATP localizada no sarcolema do miócito cardíaco, representa a principal forma de extrusão do  $\text{Ca}^{2+}$  para o meio extracelular. Embora o trocador  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  possa operar também no modo reverso, o

influxo de  $\text{Ca}^{2+}$  através deste transportador nestas condições é pequeno.

Outro alvo bem descrito da PLN é a TnI (Li e cols., 2000), que uma vez fosforilada apresenta menor afinidade ao cálcio no complexo actina-miosina. Como consequência ocorre aceleração da contração e do relaxamento miocárdico.

No repouso, quando a concentração de cálcio intracelular é baixa ( $\sim 10^{-7}$  M), o sítio da TnC sensível ao cálcio está desocupado. Nesta condição a interação entre TnI e TnC é fraca, favorecendo a interação de TnI com actina. Isto favorece a configuração do complexo troponina-tropomiosina de tal forma a esconder o sítio ativo da actina, que interage com a miosina. Quando a  $[\text{Ca}^{2+}_i]$  aumenta ( $10^{-6}$ ~ $10^{-5}$  M), o  $\text{Ca}^{2+}$  se liga ao seu sítio na TnC. Esse fenômeno favorece a interação da TnC com TnI, a qual desestabiliza a interação da TnI com a actina. A interação TnC-TnI desloca a TnI do sítio ativo da actina, retirando o impedimento estérico, que ocorre em baixas concentrações de cálcio. Dessa forma, a miosina pode-se ligar a actina, ativando a atividade ATPásica da miosina, sendo dessa forma deflagrada a contração, através do fenômeno da cooperatividade (Bers., 2008).

A figura 3 resume os principais eventos do AEC que ocorre em cardiomiócitos ventriculares.



**Figura 3: Acoplamento EC no cardiomiócito.** Abertura de canais de cálcio tipo-L na membrana celular, levam a um aumento da concentração intracelular de cálcio, induzindo a liberação de  $\text{Ca}^{2+}$  pelo retículo sarcoplasmático (SR). Íons cálcio deixam o retículo sarcoplasmático por meio de receptores de rianodina (RyR). No citosol, íons cálcio ativam os miofilamentos. O  $\text{Ca}^{2+}$  liga-se à troponina C (TnC) e, ao favorecer a interação da TnC com a troponina I (TnI), faz com que a TnI se desloque do sítio ativo da actina, permitindo o deslocamento da tropomiosina (TmT) e da troponina T (TnT), o que permite a interação miosina-actina. Após a ocorrência da contração, o  $\text{Ca}^{2+}$  é recaptado principalmente pela bomba de  $\text{Ca}^{2+}$  do retículo sarcoplasmático (ATP), a qual tem sua atividade modulada pela fosfolambana (PLB). Adicionalmente, o  $\text{Ca}^{2+}$  pode ser transportado para o interior da mitocôndria via o transportador uniporte de  $\text{Ca}^{2+}$  e colocado no citoplasma pelo transportador antiporte  $\text{Na}/\text{Ca}^{2+}$  (NCXO inset representa os eventos que caracterizam o acoplamento eletromecânico existente na célula cardíaca, a saber: o potencial de ação, o aumento do transiente de cálcio e a contração celular. (Adaptado de Bers, 2002).

É importante notar que a ativação do receptor de rianodina funciona como um amplificador de alto ganho do sinal de  $\text{Ca}^{2+}$  gerado pelo influxo desse íon na célula cardíaca (Guatimosim e cols., 2002). Existe uma relação direta entre a tensão desenvolvida pelos miofilamentos e a concentração intracelular de  $\text{Ca}^{2+}$ . Em geral, quanto maior a  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  maior a tensão desenvolvida. Alguns hormônios como a aldosterona, neurotransmissores e drogas alteram a corrente de entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  durante o platô do potencial de ação ou alteram os estoques de  $\text{Ca}^{2+}$  do retículo sarcoplasmático (Almeida e cols., 2013), o que conduz a alterações diretas na tensão produzida pelas células miocárdicas.

Na fase diastólica do AEC é possível encontrar eventos de liberação espontânea de  $\text{Ca}^{2+}$ . Estes eventos de liberação espontânea de  $\text{Ca}^{2+}$  são chamados “sparks espontâneas de  $\text{Ca}^{2+}$ ”. As *sparks* espontâneas de  $\text{Ca}^{2+}$  representam o aumento local de cálcio proveniente da abertura dos RyR2s, quando a célula está em repouso. Uma *spark* espontânea ocupa uma área de aproximadamente  $2,0 \mu\text{m}$  de diâmetro e um volume de 8 fl (Cheng & Lederer 2008). Para que ocorram as *sparks* espontâneas de  $\text{Ca}^{2+}$  não é necessária a entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  no miócito através dos canais de  $\text{Ca}^{2+}$  do tipo L ou por outros mecanismos através da membrana plasmática. Alguns estudos mostram que no potencial de repouso de  $-80 \text{ mV}$ , mesmo com a retirada total do  $\text{Ca}^{2+}$  extracelular, ainda assim são encontradas *sparks* espontâneas de  $\text{Ca}^{2+}$  (Cheng 1993; Cannell 1994). A abertura dos RyR2s para ocorrerem estes eventos espontâneos dependem da concentração de  $\text{Ca}^{2+}$  no citosol e da concentração de  $\text{Ca}^{2+}$  no lúmen do RS ( $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{RS}}$ ). No que se refere à  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{RS}}$ , alguns estudos apontam um papel crítico do conteúdo de  $\text{Ca}^{2+}$  no RS na regulação dos RyR2 e na sinalização do  $\text{Ca}^{2+}$  no AEC. A queda da concentração de  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{RS}}$  promove o fechamento dos RyR2,

promovendo o encerramento das *sparks* espontâneas de  $\text{Ca}^{2+}$ . Em contrapartida, um aumento excessivo na  $[\text{Ca}^{2+}]$  no RS promove um aumento na sensibilidade dos RyR2, aumentando a frequência de *sparks* espontâneas (Cheng 1996; Santana 1997; Gyorke 1998). Uma consequência importante da ativação do receptor de mineralocorticoide (MR) pela aldosterona é o remodelamento elétrico cardíaco. A importância desse fenômeno pode ser reconhecida devido à prevalência de arritmias atriais e ventriculares associadas à insuficiência cardíaca. Portanto, tem sido sugerido que antagonistas de MR reduzem a incidência de fibrilação atrial por melhorar o remodelamento atrial (Schnabel e cols 2010). Em contrapartida, existem evidências que confirmam que a ativação de MR pela aldosterona tem efeitos diretos na dinâmica do  $\text{Ca}^{2+}$  em cardiomiócitos, o que predispõe a ocorrência de arritmias. Com as técnicas de whole-cell patch-clamp, observou-se um aumento no número de eventos arrítmicos no cardiomiócito proveniente de ratos adultos e camundongos que superexpressam MR no coração, quando expostos a aldosterona ( $10^{-7}$  mol/L) por 48 horas. Estes achados são atribuídos a diminuição da proteína de ligação ao receptor de rianodina FKBP12.6, levando a uma atividade aumentada do mesmo, permitindo assim *sparks* de  $\text{Ca}^{2+}$  mais duradouras e prolongadas. (Gómez cols., 2009). Assim, um efeito protetor dos antagonistas de mineralocorticoide (MR) seria diminuir a duração e o prolongamento de *sparks* de  $\text{Ca}^{2+}$  em cardiomiócitos e potencialmente limitar a ocorrência de arritmias através deste mecanismo.

## **2.6 Hipertensão arterial sistólica e sinalização de $\text{Ca}^{2+}$**

Algumas doenças, como a HAS (Hipertensão arterial sistólica), podem alterar os mecanismos envolvidos no processo de AEC. O estresse imposto pela HAS crônica promove adaptações patológicas no músculo cardíaco, principalmente no ventrículo esquerdo (VE). Essas adaptações são uma resposta do músculo cardíaco saudável à sobrecarga de trabalho e estão associadas com o aparecimento de disfunções na sinalização do  $\text{Ca}^{2+}$ , como a redução na atividade e expressão da SERCA 2A (Dash e cols., 2001, Bers, 2002<sup>a</sup>, Almeida e cols., 2015), PLB (Almeida e cols., 2015), aumento na expressão e atividade do NCX, (Sipido e cols., 2002; Xiong e cols., 2005), o prolongamento no PA (Kaab e cols., 1998; Wickenden e cols., 1999; Lacombe e cols., 2007), o aumento na distância entre o RS e os túbulos-T (Song e cols., 2006) e o aumento da frequência de liberação das *sparks* espontâneas de  $\text{Ca}^{2+}$  do RS (Marks e cols., 2002).

Nos estágios iniciais da HAS observa-se um aumento do fluxo de liberação de  $\text{Ca}^{2+}$  e um aumento da contratilidade celular para compensar o aumento da

sobrecarga de pressão e manter o débito cardíaco. Esse processo ocorre principalmente em função do aumento da atividade dos RyR2s (Chen-Izu et al., 2007). Em estágios mais avançados, há uma diminuição na atividade da SERCA2A, acompanhado de um aumento na atividade dos NCX, provocando uma maior saída de  $Ca^{2+}$  dos cardiomiócitos, o que reduz o conteúdo de  $Ca^{2+}$  do RS. Isso contribui para que o transiente de  $[Ca^{2+}]_i$  seja menor e mais lento, gerando uma maior concentração de  $Ca^{2+}$  citosólico durante a diástole (Bers, 2002a; Kemi e cols., 2008). O organismo exposto a um longo período de hipertensão sustentada gera uma hipertrofia cardíaca patológica que poderá evoluir para uma insuficiência cardíaca (Bing e cols., 2002). Desta forma vários estudos têm relatado disfunções no AEC com a instalação da insuficiência cardíaca. A insuficiência cardíaca é um estado crônico em que as perturbações no ciclo do  $Ca^{2+}$  ocorrem simultâneas à deterioração da função cardíaca e ao aumento da arritmogênese (Houser e cols., 2000; Wasserstrom e cols., 2009). Algumas disfunções têm sido relatadas no AEC com a instalação da insuficiência cardíaca, como a diminuição na rede de túbulos-T, provocando um aumento na distância entre os RyR2s e os DHPR (Balijepalli, e cols., 2003), disfunções na ativação dos RyR2, provocando uma liberação desordenada de  $Ca^{2+}$  do RS (Song, e cols., 2006) e a diminuição da captação de  $Ca^{2+}$  pelo RS em função da diminuição na atividade e expressão da SERCA2A (Hasenfuss, 1998; Dash e cols., 2001).

## **2.7 VIAS DE SINALIZAÇÃO ATIVADAS PELA ANGIOTENSINA-(1-7) NO CARDIOMIÓCITO**

A síntese local de Ang-(1-7) no coração foi primeiramente detectada em cães após isquemia aguda do miocárdio (Santos e cols., 1990). Desta forma, surgiam as primeiras evidências de que o dano tecidual cardíaco é um estímulo para formação local de um sistema contrarregulatório mediado pela Ang-(1-7), sendo a ECA2 a principal enzima envolvida na formação deste peptídeo no coração (Crackower e cols., 2002).

Desde então, diversos estudos têm mostrado que, além de inibir o efeito pressor sistêmico, a Ang-(1-7) inibe os efeitos deletérios locais da Ang II (Ferrario e cols., 1997; Grobe e cols., 2006; Giani e cols., 2007). A ação local da Ang-(1-7) especificamente no coração tem sido proposta em diversos trabalhos. Dentre estes, Grobe e cols., (2006) mostraram que a Ang-(1-7) previne o surgimento de fibrose cardíaca sem alteração dos níveis pressóricos sistêmicos de ratos hipertensos. Sendo assim, o coração tem sido considerado um dos principais alvos de estudo das ações da Ang-(1-7).



A Ang-(1-7) diminui a duração do período de arritmia durante a reperfusão do miocárdio após a oclusão da coronária esquerda e melhora a contratilidade cardíaca nestas condições (Ferreira e cols., 2001; Santos e cols., 2004). Loot e cols., (2002), mostraram que após o infarto do miocárdio, a infusão crônica de Ang-(1-7) por 8 semanas atenuou o processo de falência cardíaca e melhorou a função endotelial aórtica em ratos. Além disso, animais transgênicos que superexpressam Ang-(1-7) tem os níveis plasmáticos deste peptídeo aumentados em 2,5 vezes e apresentam melhora significativa de todos os parâmetros da função cardíaca após a isquemia aguda do miocárdio (Santos e cols., 2004).

Cardiomiócitos sintetizam ON, que apresenta funções importantes na fisiologia do cardiomiócito. Estas incluem a regulação do AEC, do consumo de oxigênio, do estresse oxidativo e da resposta hipertrófica, como recentemente revisto (Hare & Stamler, 2005; Hare, 2003; Belge e cols., 2005; Massion e cols., 2003; Paulus & Bronzwaer, 2004; Sartori e cols., 2005; Danson e cols., 2005). A modulação ocorre tanto de forma direta, por reações de nitrosilação, ou indireta, via produção de GMP cíclico (GMPc) e ativação da proteína quinase G (PKG). Por estes mecanismos o ON pode levar a alteração da atividade do receptor de rianodina (Petroff e cols., 2001), do canal de  $Ca^{2+}$  tipo-L (Kokoz e cols., 2007), da SERCA2 e da PLN (Wang e cols., 2008).

O ON derivado da NOS1 regula a contratilidade e o relaxamento miocárdico e tem importantes ações na resposta  $\beta$ -adrenérgica. Os mecanismos intracelulares exatos responsáveis por estes efeitos, ainda são matéria de debate, mas é bem estabelecido que o ON derivado da NOS1 age no RS modulando a atividade do RyR e da  $Ca^{2+}$  ATPase do RS (SERCA2A) (Hare, 2003; Belge e cols., 2005; Massion e cols., 2003). Deste modo, o ON derivado da NOS1 intensifica o efeito inotrópico tanto dos agonistas  $\beta$ -adrenérgicos (Barouch e cols., 2002; Dawson e cols., 2005) como o gerado por aumento da frequência cardíaca (Khan e cols., 2004).

O ON derivado da NOS3 regula a resposta  $\beta$ adrenérgica através da inibição do canal de  $Ca^{2+}$  do tipo-L e da atenuação da contratilidade estimulada via  $\beta$ -adrenérgica (Barouch e cols., 2002; Khan e cols., 2003; Balligand e cols., 1995). A ligação das catecolaminas ao receptor  $\beta$ -adrenérgico ativa a NOS3 e leva a aumento no GMPc e ativação de PKG, com efeitos antagônicos sobre os receptores  $\beta$ 1- e  $\beta$ 2-adrenérgicos (Moniotte e cols., 2001; Morimoto e cols., 2004). Além deste mecanismo, o canal de cálcio tipo-L também pode ser negativamente modulado diretamente pelo ON através da S-nitrosilação (Sun e cols., 2006; Campbell e cols., 1996).

Já foi demonstrado por Dias-Peixoto e cols., 2008 e Gomes e cols., 2012 que a Ang-(1-7) produz ON em cardiomiócitos por ativar NOS3 e NOS1 modulando através deste a sinalização de  $Ca^{2+}$ .

Em cardiomiócitos, a exposição aguda a Ang-(1-7) não tem efeito demonstrável no transiente  $Ca^{2+}$  mas promove liberação de óxido nítrico (ON) (Dias-Peixoto e cols., 2008; Costa e cols., 2010). Ao passo que, a exposição crônica a Ang-(1-7) ou a deleção genética do receptor Mas produz alterações significativas sobre as proteínas envolvidas na dinâmica do  $Ca^{2+}$  (Gomes e cols., 2012; Santos e cols., 2006). Ratos transgênicos que super expressam Ang-(1-7) no coração apresentam um aumento na amplitude do transiente de  $Ca^{2+}$ , uma recaptação mais rápida do  $Ca^{2+}$ , e aumento na expressão de SERCA2 em cardiomiócitos. (Ferreira e cols., 2010). Em 2010, Gomes e colaboradores mostraram que cardiomiócitos ventriculares provenientes de ratos transgênicos que possuem aumento crônico de Ang-(1-7) plasmática (TGR(A1-7)3292) apresentaram prevenção na disfunção da sinalização do cálcio induzida pela AngII, quando comparados aos cardiomiócitos de animais selvagens. Este estudo demonstra que a Ang-(1-7) está envolvida de forma indireta na sinalização de cálcio. Em contrapartida, cardiomiócitos isolados de camundongos Mas-KO (nocaute) têm um menor pico e recaptação do transiente de  $Ca^{2+}$ , causada, provavelmente, por causa da diminuição da expressão de SERCA2.(Gomes e cols., 2012). Alterações nas proteínas envolvidas na sinalização de  $Ca^{2+}$  em cardiomiócitos Mas-KO foram acompanhadas por mudanças na maquinaria de produção de ON (Dias-Peixoto e cols., 2008; de Almeida e cols., 2013).

Outro conceito importante na fisiologia do ON é o balanço entre espécies reativas de oxigênio (EROS), entre as quais se inclui o superóxido ( $O^-$ ) e espécies reativas de nitrogênio (ERN), dentre as quais se inclui o ON. Este balanço recebeu a denominação de balanço nitroso oxidativo (Hare & Stamler, 2005). O ON regula diversas cascatas cardíacas, como o acoplamento EC, o inotropismo e o lusitropismo (Hare, 2003;Belge e cols., 2005;Massion e cols., 2003;Danson e cols., 2005;Hare, 2004a); e em muitos destes casos tanto as EROS quanto as ERN participam (Hare & Stamler, 2005).

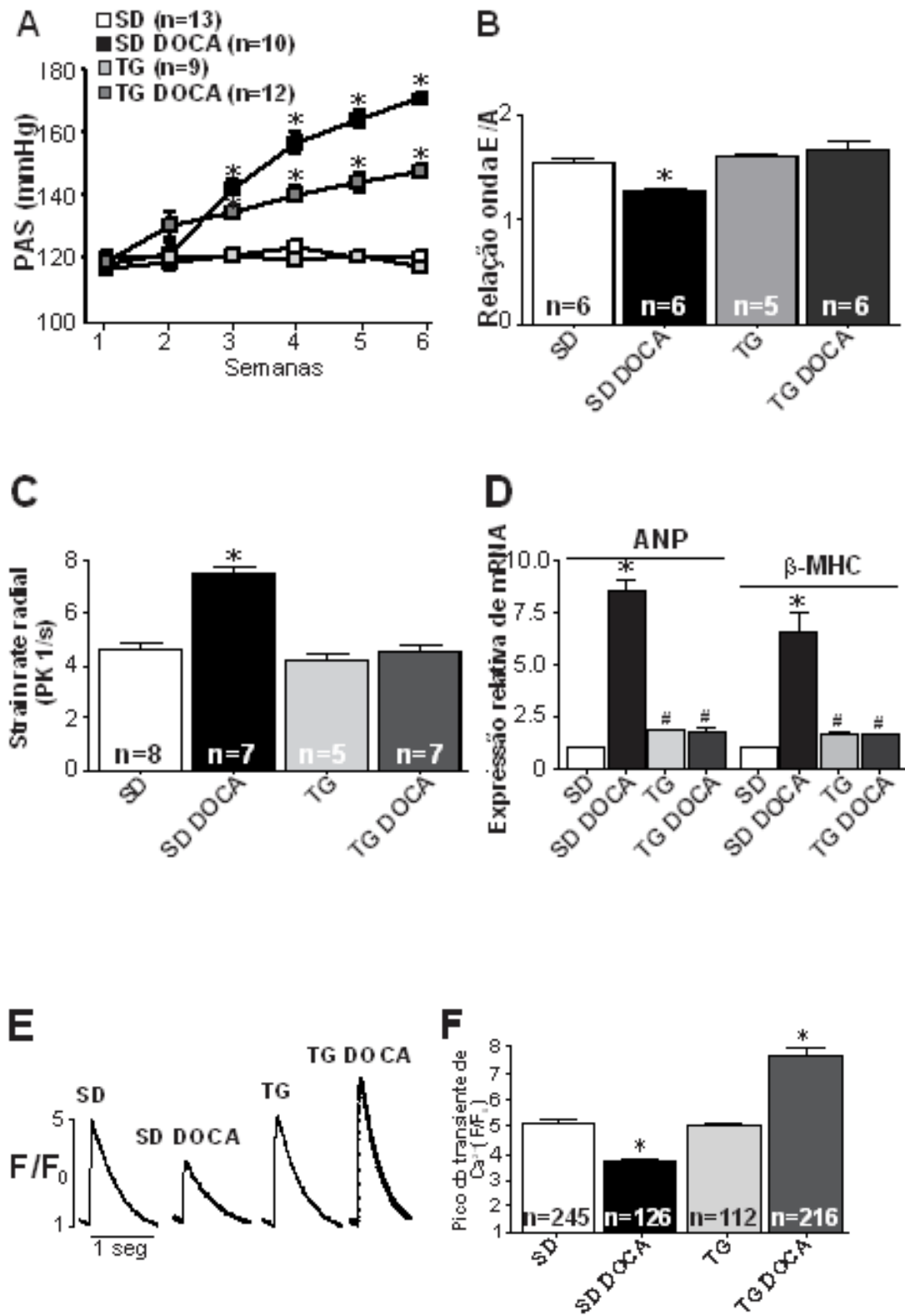
Alteração no equilíbrio fisiológico entre ON e EROS está envolvida de maneira crítica no desenvolvimento de doenças cardiovasculares. Recentemente foi demonstrado que a aldosterona aumenta os níveis de EROS em miócitos ventriculares, através da ativação da NADPH oxidase (Rossier e cols., 2008). Além do que os receptores de RyR são sensíveis a sinalização redox (Prosser e cols., 2011).



intracelular, e inibe a atividade da xantina oxidoreductase (XOR). A XOR e a NADPH oxidase são duas das principais fontes de espécies reativas de oxigênio no coração. Ao nível do sarcolema, a NOS endotelial (NOS3) é estimulada pelo receptor  $\beta$ -adrenérgico, e o ON derivado da NOS3, via GMPc, estimula a proteína quinase (PKG), que modula negativamente o canal de cálcio tipo L (CCT-L). Além disso, o ON derivado da NOS3 promove S-nitrosilação do CCT-L. Ambas as ações contribuindo para modular negativamente o CCT-L e reduzir a resposta ao estímulo  $\beta$ -adrenérgico. Postula-se também que a NOS3 possa regular negativamente a atividade da NADPH oxidase. Por outro lado, o superóxido ( $O_2^-$ ) produzido localmente pode contraregular ações do óxido nítrico. No RS a oxidação do receptor de rianodina reduz sua atividade, e ao nível do sarcolema o  $O_2^-$  pode provocar desacoplamento da NOS3. A NOS3 desacoplada é mais uma fonte de superóxido. Ainda há a combinação do ON ao  $O_2^-$  gerando peroxinitrito (ONOO<sup>-</sup>) que possui efeitos tóxicos na célula pela sua ação oxidante. (Adaptado de Hare & Stamler 2005)

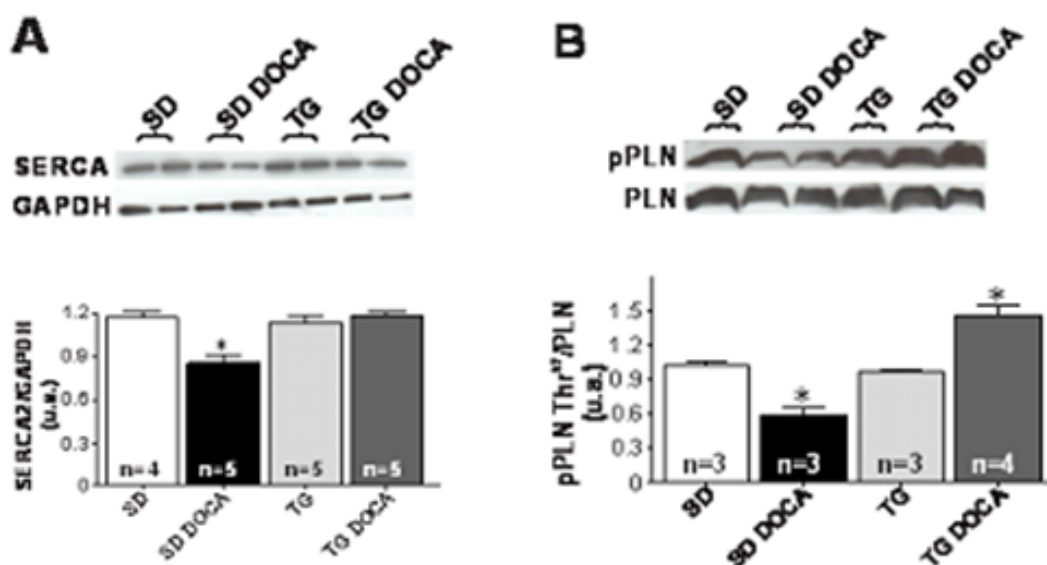
É importante ressaltar a interação entre NOS1 e XOR. A deficiência de NOS1 leva ao aumento substancial da produção de EROS pela XOR, sugerindo que a NOS1 endogenamente limita a atividade da XOR. De acordo, o camundongo com deleção da NOS1 (NOS1<sup>-/-</sup>) é um modelo para o estudo do desequilíbrio nitroso-oxidativo, na qual a atividade da NOS1 é ausente e a da XOR é aumentada. Este camundongo apresenta grande aumento na produção de  $O_2^-$  mediada pela XOR, menor resposta ao estímulo  $\beta$ -adrenérgico e menor sensibilidade dos miofilamentos ao cálcio (Khan e cols., 2004). Esta última é revertida pela inibição aguda da XOR (Khan e cols., 2004).

No meu trabalho de mestrado mostrei que a Ang-(1-7) é capaz de proteger *in vivo* cardiomiócitos de ratos submetidos a uma ativação excessiva dos receptores de mineralocorticoides, através da administração de DOCA. De acordo com Santiago e colaboradores, 2010, ratos transgênicos com superexpressão da Ang-(1-7)(TG) apresentaram aumento atenuado da pressão arterial sistólica, além de estarem protegidos da disfunção diastólica e da reexpressão de genes fetais induzidas pelo DOCA (figura 6). No plano celular, o aumento dos níveis de Ang-(1-7) levou a uma maior liberação de  $Ca^{2+}$  do retículo sarcoplasmático e a fosforilação da fosfolambam (figura 5). Em especial, chamou a atenção o fato de que a Ang-(1-7), em condições de ativação do receptor de mineralocorticoide, induziu um aumento significativo na sinalização de cálcio (Figura 5E e 5F). Tomados em conjunto, estes dados sugerem uma importante relação entre Ang-(1-7) e aldosterona na sinalização de  $Ca^{+2}$  no coração, que culmina com a ativação da maquinaria celular envolvida na proteção dos cardiomiócitos. Avaliar se de fato estas duas vias de sinalização interagem, e o impacto dessa interação para dinâmica de  $Ca^{2+}$  em miócitos ventriculares é o objetivo deste trabalho.



**Figura 5: Ratos que super expressam Ang-(1-7) estão protegidos das alterações cardíacas induzidas pelo modelo de hipertensão DOCA-sal. A.** Pressão Arterial Sistólica obtida em ratos SD and TG submetidos ou não ao modelo DOCA-sal durante 6 semanas. Valores de PAS obtidas através de pletismografia de cauda nos animais SD, SD-DOCA, TG e TG-DOCA expressas em mmHg. **B.** Relação

da onda E/A está significativamente reduzida em animais SD-DOCA. **C.** Ratos SD-DOCA apresentaram aumento significativo na média do strain rate radial. **A-C** n=número de ratos analisados. \*=p<0.05 quando comparado aos outros grupos experimentais. **D.** PCR em tempo real comparando a expressão de genes que codificam mRNA para ANP e  $\beta$ -MHC em cardiomiócitos de SD e TG rats tratados ou não com DOCA. Cardiomiócitos de ratos SD-DOCA apresentaram aumento na expressão de genes fetais. Gráfico de barras apresenta o resultado de no mínimo 5 experimentos independentes. **E.** Perfil representativo do transiente de  $Ca^{2+}$  obtido de miócitos ventriculares estimulados na frequência de 1Hz.. A amplitude do transiente de  $Ca^{2+}$  é representada pela razão  $F/F_0$ . **F.** Gráfico de barras representando a amplitude do transiente de  $Ca^{2+}$  ( $F/F_0$ ) obtida de cardiomiócitos provenientes de cada grupo experimental. n = número de células analisadas. Em **D** e **F** \*= p <0.05 versus outros grupos. # = p<0.05 versus SD e SD-DOCA. (Almeida e cols., 2015)



**Figura 6: Alterações no perfil de proteínas envolvidas no manejo do cálcio em cardiomiócitos de ratos DOCA-sal são prevenidas nos ratos TG. A-B.** No painel superior, western-blots representativos de SERCA2A e PLN. **A-B** No painel inferior, gráficos de barras representativos mostrando as médias das densidades das bandas em unidades arbitrárias. (a.u). \*= p <0.05 quando comparado com animais SD. n = números de amostras de corações analisados. (Almeida e cols., 2015).

### 3. OBJETIVOS:

#### 3.1 Objetivo geral

Investigar a existência de um possível *cross-talk* entre a sinalização da aldosterona e Ang-(1-7) em miócitos ventriculares visando identificar suas consequências funcionais e mecanismos subjacentes.

#### 3.2 Objetivos específicos

- 1) Verificar a dinâmica do  $\text{Ca}^{2+}$  em cardiomiócitos ventriculares tratados com o aldosterona ( $1\mu\text{M}$ ) onde tanto receptores de MR e GR estão ativados na presença ou não da Ang-(1-7). Será avaliado o transiente de  $\text{Ca}^{2+}$ , o conteúdo de  $\text{Ca}^{2+}$  do retículo sarcoplasmático (RS) e a frequência das *sparks* de  $\text{Ca}^{2+}$  nos diferentes grupos experimentais, através de microscopia confocal.
- 2) Avaliar se os efeitos da Ang-(1-7) no transiente de  $\text{Ca}^{2+}$  em células tratadas com aldosterona são mediados pelo receptor Mas.
- 3) Avaliar a amplitude da corrente de cálcio do tipo-L nos cardiomiócitos ventriculares dos diferentes grupos de tratamento através da técnica de Patch Clamp.
- 4) Avaliar a expressão e fosforilação de diferentes proteínas e enzimas que participam da modulação do  $\text{Ca}^{2+}$  no cardiomiócito, através da técnica de western-blot. Mais especificamente, iremos investigar a fosforilação da fosfolamban, no sítio da serina<sup>16</sup> e a expressão da PLN total.
- 5) Avaliar os efeitos da Ang-(1-7) sobre a produção de ON em cardiomiócitos tratados com aldosterona utilizando a técnica de microscopia confocal.
- 6) Analisar a expressão das isoformas da sintase do óxido nítrico (NOS1 e NOS3) fosforilada e total e também avaliar a nitrozilação de proteínas em cardiomiócitos por meio da técnica de Western Blot.
- 7) Avaliar a produção de espécies reativas de oxigênio (EROS) através da sonda MitosoxRed que detecta EROS mitocondrial por meio da microscopia confocal.
- 8) Verificar a dinâmica do  $\text{Ca}^{2+}$  em cardiomiócitos ventriculares tratados com o aldosterona ( $10\text{nM}$ ), condição esta em que são ativados prioritariamente

receptores de MR, na presença ou não de Angiotensina-(1-7), através da avaliação do transiente de  $Ca^{2+}$ . Verificar também os efeitos do antagonista de MR (Spironolactona) nessa resposta.



## 4. MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1. Animais

Neste estudo foram utilizados 32 ratos machos Spreague-Dawley (SD) (250gramas) e 9 camundongos machos (4, C57/BL6 *Mas*<sup>+/+</sup> e 5 *Knockout* para receptor *Mas*). Os camundongos *Mas*<sup>-/-</sup> foram descritos anteriormente por Walther e colaboradores em 1998. Os animais foram mantidos em sala apropriada com ciclo claro-escuro de 12/12h a temperatura ambiente 22-24°C, na Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), em gaiolas plásticas adequadas e alimentados com ração e água filtrada *ad libitum* conforme as diretrizes do NIH para cuidado com os animais. Os experimentos realizados foram aprovados pelo comitê de ética em experimentação animal da UFMG (protocolo número ° 68/2009).

### 4.2. Grupos experimentais

Neste trabalho foram utilizados cardiomiócitos ventriculares que foram divididos nos seguintes grupos experimentais:

- (i) grupo controle de células não tratadas.
- (ii) grupo que receberá Aldosterona na concentração final de 1µM.
- (iii) grupo que receberá Aldosterona 1µM + peptídeo Ang-(1-7) (100nM).
- (iv) grupo que receberá peptídeo Ang-(1-7) (100nM).
- (v) grupo que receberá Aldosterona 1µM + peptídeo Ang-(1-7) (100nM) e um dos inibidores: spironolactona inibidor de receptor de mineralocorticoíde (MR) (10 µM), mifepristona inibidor de glicocorticoíde (GR) (10 µM), pki, inibidor da PKA (10 µM), H89 também inibidor de PKA, L-NAME – inibidor das óxido nítrico sintases (NOS)(10 µM), *L-Dbu* (L-ArgNO<sub>2</sub>) (1µM), – bloqueador da oxido nitrico sintase neuronal.
- (vi) grupo que receberá Aldosterona na concentração final de 10nM.
- (vii) grupo que receberá Aldosterona 10nM + peptídeo Ang-(1-7) (100nM).
- (viii) grupo que receberá Aldosterona 10nM + peptídeo Ang-(1-7) (100nM) e um dos inibidores: spironolactona inibidor de receptor de mineralocorticoide (MR).

### 4.3. Inibidores utilizados nos protocolos experimentais em cardiomiócitos

Todos os grupos de células ficaram 30 minutos em meio DMEM antes de realizarmos os experimentos de Ca<sup>2+</sup> e medida de espécies reativas de oxigênio, ou, a lise celular para experimentos de PCR em tempo real ou western-blot.

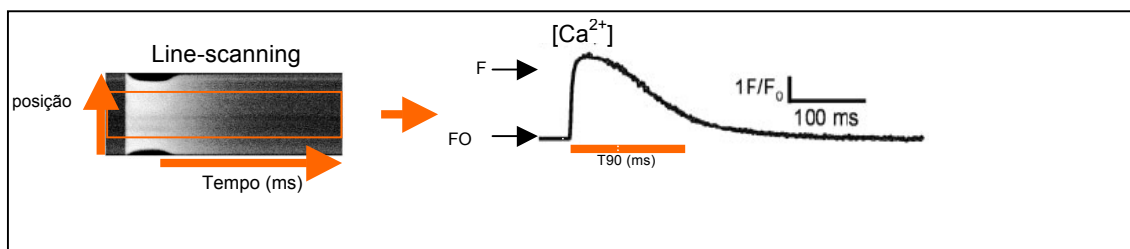
Todos os experimentos foram realizados com miócitos ventriculares isolados incubados durante 30min com aldosterona (Sigma, 1  $\mu\text{mol/L}$ ), Ang-(1-7) (Millipore, 100 nmol/L), ou a conjugação dos dois compostos. Em alguns experimentos os cardiomiócitos de ratos adultos foram pré-incubados 20 minutos antes com alguns inibidores citados anteriormente no trabalho, antes da adição de aldosterona e ou Ang-(1-7) tratados com os seguintes inibidores: L-NAME - óxido nítrico sintases (NOS) *NG*-nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME, Sigma, 10  $\mu\text{mol/L}$ ); ), *L-Dbu* (L-ArgNO<sub>2</sub>), – bloqueador da oxido nítrico sintase neuronal, spironolactona (antagonista de receptor mineralocorticoide) (Sigma, 10  $\mu\text{mol/L}$ ), mifepristona inibidor de glicocorticoide (GR) (Sigma, 10  $\mu\text{mol/L}$ ), pki, inibidor da proteína kinase A PKi (Calbiochem, 10 $\mu\text{mol/L}$ ) , H89 também inibidor de PKA (10 $\mu\text{mol/L}$ ).

#### **4.4. Isolamento dos cardiomiócitos ventriculares adultos e medida do transiente de $\text{Ca}^{2+}$**

Para a obtenção dos cardiomiócitos foi utilizado o procedimento padrão para a dissociação enzimática do tecido (Mitra & Morad, 1985). Para o isolamento foram utilizadas apenas as câmaras ventriculares. Após a dissociação dos cardiomiócitos ventriculares, as células frescas foram colocadas em meio de cultura DMEM (Sigma) com soro (até a sua utilização com duração máxima de 4 horas). Miócitos ventriculares adultos foram isolados e armazenados em meio modificado (DMEM, Sigma), até a sua utilização em um período que não excedesse 4 horas, conforme descrito anteriormente por Oliveira e cols 2007.

A aquisição de imagens e medida da concentração intracelular de  $\text{Ca}^{2+}$  ( $[\text{Ca}^{2+}]_i$ ) no miócito cardíaco foi realizada utilizando o microscópio confocal Zeiss 510 Meta (CAPI, ICB, UFMG), na configuração *line-scan*, com o intuito de obter informações sobre a amplitude e a cinética do transiente de  $\text{Ca}^{2+}$ , conforme descrito por Guatimosim e cols., 2001. Para a aquisição das imagens foi utilizada uma lente objetiva de imersão a óleo (63x). Os sinais de fluorescência foram obtidos por meio de varredura em linha (Line Scan Mode). A linha de varredura (512 pixels) foi posicionada aleatoriamente no eixo longitudinal da célula, com o cuidado de não cruzar regiões de núcleos. A varredura foi feita por meio de um laser de argônio (488 nm). As varreduras foram repetidas a cada 1,54 ms, sendo utilizadas para a criação de imagens (tempo no eixo x e fluorescência no eixo y). O estímulo dado corresponde a 1,0 Hz, com um pulso quadrado de duração de 5ms e 30V. Oito pulsos elétricos foram aplicados antes da aquisição da imagem. Inicialmente, os cardiomiócitos foram incubados por 30 min com a sonda Flúor-4, AM, (10 $\mu\text{mol/L}$ ), sensível à concentração de cálcio, cujo

comprimento de onda de excitação é 488 nm e o de emissão, 515. Após a marcação, os cardiomiócitos foram mantidos em solução de Tyrode, à temperatura ambiente e posteriormente divididas nos diferentes grupos experimentais. A figura 7 é uma representação do transiente de  $\text{Ca}^{2+}$  típico, obtido por meio da microscopia confocal, em cardiomiócitos de animais controle. Para a análise dos dados do transiente de  $\text{Ca}^{2+}$  foram utilizados os programas Prism e Excel .



**Figura 7. Transiente de cálcio em cardiomiócitos ( $F/F_0$ ).** F representa a fluorescência máxima emitida no momento da contração do miócito ventricular.  $F_0$  representa a fluorescência basal emitida no momento de repouso da célula.

#### 4.5. Medida do conteúdo de $\text{Ca}^{2+}$ do retículo sarcoplasmático (RS)

As células foram plaqueadas em lamínulas e perfundidas no banho que estava acoplado ao microscópio confocal. Esse banho continha uma solução composta de (em mM): 140 LiCl, 1  $\text{MgCl}_2$ , 10 HEPES, 10 Glicose, 5 KCl, 1 EGTA e 10 Cafeína, e o pH=7,4, este ajustado com LiOH. Esta solução era livre de  $\text{Na}^+$  a fim de evitar a participação do trocador  $\text{Na}^+\text{Ca}^{2+}$ . As células foram estimuladas eletricamente com uma série de pulsos de pré-condicionamento (1 Hz), antes da solução de cafeína ser aplicada para estimular os receptores de rianodina (RyR) e após a interrupção do estímulo foram perfundidas com a solução descrita acima. Sabe-se que a cafeína na concentração de 10 mmol/L é responsável pela estimulação direta dos RyR. Este fenômeno foi utilizado como um indicador do conteúdo de  $\text{Ca}^{2+}$  do retículo sarcoplasmático (RS). O nível de  $\text{Ca}^{2+}$  foi relatado como  $\Delta F/F_0$ , onde  $F_0$  é fluorescência de  $\text{Ca}^{2+}$  basal e F representa a fluorescência máxima.

#### 4.6. Medida e análise das sparks espontâneas de $\text{Ca}^{2+}$

Miócitos ventriculares foram incubadas com Flúor-4 AM e a frequência de sparks de  $\text{Ca}^{2+}$  foram avaliadas no seu estado basal. Para as medidas das sparks espontâneas de  $\text{Ca}^{2+}$  os cardiomiócitos isolados foram incubados com o indicador fluorescente de  $\text{Ca}^{2+}$ , permeável à membrana plasmática, Fluo-4 acetoximetil-éster (Fluo-4 AM, Molecular Probes, Eugene, OR, USA). O Fluo-4 AM (5  $\mu\text{M}$ ) foi preparado em uma solução a base de DMSO, (30 $\mu\text{L}$  de DMSO em 50 $\mu\text{g}$  de Fluo-4 AM). As

células foram incubadas com 5 $\mu$ L de Fluo-4 AM em volume final de 500  $\mu$ L durante 20 min à temperatura ambiente. Após este tempo, as células foram lavadas e suspensas em solução tampão Tyrode, para remover o excesso da sonda fluorescente. Quando esta sonda está ligada ao Ca<sup>2+</sup> e é excitada com o comprimento de onda de 488 nm emite um sinal de fluorescência medido a 510 nm, que se relaciona às variações de Ca<sup>2+</sup> sarcoplasmática. Tais variações foram expressas em relação à razão: F/F<sub>0</sub>, onde F<sub>0</sub> representa a fluorescência basal de Ca<sup>2+</sup>, ou seja, os ruídos do fundo da imagem (background noise) e F representa a fluorescência das sparks espontâneas de Ca<sup>2+</sup> em um dado momento de ocorrência, nos cardiomiócitos sem estímulo prévio. O procedimento para determinar F<sub>0</sub> consiste em duas etapas. Primeiro, selecionamos a *spark* espontânea de Ca<sup>2+</sup> a ser analisada e identificamos o valor mínimo da imagem de fundo das *sparks* através das opções (Analyze – Histogram) no programa ImageJ. Segundo, inserimos o valor mínimo da imagem de fundo obtida, na opção background no programa SparkMaster. Este procedimento foi feito para cada imagem analisada.

Foram obtidas 10 imagens por célula, sendo que estas foram analisadas utilizando-se a interface gráfica SparkMaster, programa de análise de *sparks* inserido no software livre ImageJ (Picht e cols., 2007). O SparkMaster é um programa automatizado que foi desenvolvido e adaptado a partir de algoritmos específicos para análises das *sparks* medidas por microscopia confocal (Cheng et al., 1999). Neste tipo de análise, o algoritmo identifica os sinais de fluorescência baseado nos seus desvios a partir do ruído de fundo da imagem original background noise. Assim, a imagem original é filtrada, normalizada e a média e o desvio-padrão do plano de fundo são calculados. As regiões da imagem excedendo 1,5 x desvio-padrão a partir do plano de fundo são utilizadas para a construção de uma linha de base e para a normalização da imagem total. Esta última imagem, normalizada, é utilizada para a detecção e análise das *sparks* de Ca<sup>2+</sup>, de forma que os eventos com áreas (em pixel) excedendo um limiar de detecção pré-estabelecido (3,0 x desvio-padrão acima da média) são considerados possíveis *sparks*. A média e o desvio-padrão são calculados subtraindo-se as *sparks* em potencial. Após estes procedimentos, as possíveis *sparks* são consideradas para análise se as áreas contendo valores acima do limiar de detecção pré-estabelecido contêm valores de pixel que excedem o seguinte critério: desvio-padrão x fator de limiar + média do *background*. A velocidade de varredura (scanning speed) e o tamanho do pixel (pixel size) foram 800 lps e 0,14  $\mu$ m, respectivamente. A variável analisada a partir do SparkMaster foi a frequência das *sparks* (sparks x 100  $\mu$ m<sup>-1</sup> x s<sup>-1</sup>).

#### **4.7. Medida de produção de óxido nítrico (ON)**

A medida da produção de ON em cardiomiócitos foi realizada através da marcação com uma sonda fluorescente sensível ao óxido nítrico, DAF-FM (4-amino-5-methylamino-2',7'-difluorofluorescein diacetat) (Molecular Probes), excitada no comprimento de onda de 488nm e com emissão em 515nm. Para detectar o NO citosólico, os cardiomiócitos, após isolados, foram incubados por 30 minutos, com 5µM de DAF-FM a 37°C e posteriormente foram lavados por mais 30 em solução de Tyrode (NaCl 140 mM, KCl 5mM, Glicose 10mM, MgCl<sub>2</sub> 0.5mM, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1mM, HEPES 10mM, CaCl<sub>2</sub> 1.8mM). A fluorescência decorrente da produção de NO foi medida através da microscopia confocal (Zeiss 510 Meta) (ICB, CEMEL, UFMG). As imagens foram realizadas preservando os mesmos parâmetros de aquisição de imagem em ambos os grupos controle e de cardiomiócitos tratados. A aquisição do grupo controle foi realizada no início e no fim para verificar se o nível de fluorescência não seria perdido ao longo do experimento. O tratamento dos cardiomiócitos isolados foi realizado com aldosterona (1µmol/L) ou Ang-(1-7) (100nmol/L) durante 30 minutos numa solução de Tyrode. Em alguns experimentos as células foram pré-incubadas durante 20 minutos com L-NAME (10 µmol/L), o inibidor de óxido nítrico sintase, antes da adição de Ang-(1-7) (100 nmol/L).

#### **4.8. Tratamento das células para medida da produção de EROS**

MitoSOXRed (Invitrogen) foi utilizado para medir a produção de espécies reativas de oxigênio (EROS) mitocondriais, principalmente superóxido. Cardiomiócitos isolados foram incubados com MitoSOXRed (3 mmol/l) em DMEM, durante 30 min à temperatura ambiente, seguido de lavagem. Imagens confocais foram obtidas por excitação a 488 nm e medindo a luz emitida a 585 nm em cardiomiócitos banhados em solução de Tyrode normal. Como controle positivo, 1 mmol/L de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> foi adicionada no final de cada experimento, o que resultou num aumento no sinal de fluorescência em todas as células.

#### **4.9. Western blotting**

Os cardiomiócitos ventriculares após serem dissociados, foram homogeneizados em tampão de lise (100mM NaCl, 50mM Tris-base, 5mM EDTA-2Na, 50mM Na<sub>4</sub>P<sub>2</sub>O<sub>7</sub>·10H<sub>2</sub>O, 1mM MgCl<sub>2</sub>. pH=8,0) com detergentes (Nonidet P40 1%; Triton x-100 0,3% e Sodium deoxycholate 0,5%), contendo inibidores de protease (PMSF 1mM, benzamidina 15.7mg/mL e pepstatina 10µM) e inibidores de fosfatase

(20mM NaFne 1mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>). Ao fim deste processo, o conteúdo foi centrifugado por 12 min, à 4°C e a 8.000 rpm. As proteínas foram quantificadas utilizando o método de Bradford (Bradford, 1976). Entre 30µg e 50µg de proteína foram diluídas em tampão de amostra (5X- 2M Tris pH=6,8, 20% Glicerol, 30% SDS, 25% β-mercaptoetanol, 0,1% Azul de Bromofenol) para separação em gel de SDS-PAGE (sodium dodecyl (lauryl) sulfate-poliacrilamida) na concentração de 10%, e 4% o gel de concentração. Para controle da massa molecular das proteínas, foi utilizado um padrão de massa molecular (BIO-RAD).

Após serem separadas em gel, as proteínas foram transferidas para uma membrana de PVDF. A qualidade da transferência foi monitorada através da coloração da membrana com solução de Ponceau (0,2%). As membranas foram lavadas com TBS + 1% Tween e colocada por 1 hora em solução de bloqueio (TBS-Tween com 5% de leite desnatado) a fim de bloquear ligações não específicas. Após o bloqueio, as membranas foram lavadas 5x com TBS-T por 5 min cada lavagem e em seguida foram incubadas *overnight* na câmara fria, com temperatura 4°C, com o anticorpo primário específico.

O protocolo seguido para cada anticorpo variou conforme instruções do fabricante e de acordo com o modelo melhor sucedido utilizado pelo grupo de pesquisa, como descrito por Dias-Peixoto e cols., (2008); Guatimosim e cols., (2008); Gomes e cols., (2010); Lara e cols., (2010). Os seguintes anticorpos primários foram utilizados: anti-phospho óxido nítrico sintase (NOS) 1 (Ser<sup>852</sup>) (1:800, Santa Cruz), anti-phospho NOS3 (Ser<sup>1177</sup>) (1:800, Cell Signaling), anti-PLN Ser<sup>16</sup> (1:800, Santa Cruz), anti-P-TNI (), anti-NOS1 (1:800, Millipore), anti-NOS3 (1:800, Cell Signaling), anti-nitrotirosina (1:500, Santa Cruz) e anti-gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH) (1:5000, Santa Cruz) ou pela proteína total. Todos os anticorpos foram normalizados pelo anti-gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH) (1:5000, Santa Cruz). No dia seguinte as membranas foram lavadas 5x por 5 minutos. com TBS-T% e incubadas com o anticorpo secundário conjugado a peroxidase (HRP) (Goat anti-mouse IgG-HRP 1:10.000 e Goat anti-rabbit IgG-HRP 1:10.000, (Sigma). As membranas foram novamente lavadas em TBS-T (5 minutos por 5 vezes). As bandas protéicas foram detectadas por reação de quimioluminescência (ECL plus – Amersham Biotechnology) e a intensidade das mesmas foram avaliadas por análise densitométrica através do software ImageJ (NIH). Em todos os experimentos os níveis de proteína foram normalizados pelos níveis de expressão de GAPDH.

#### **4.10. Imunofluorescência**

Os cardiomiócitos foram fixados com solução 4% de paraformaldeído (PFA) diluído em PBS 1x por 15 minutos à temperatura ambiente. Logo após, procedeu-se à lavagem para remoção do PFA e permeabilização da membrana celular utilizando solução de PBS/Triton 0,5% ou PBS/Saponina 0,5%. Após o bloqueio por 1h, os cardiomiócitos foram incubados por 2h ou overnight a 4°C com um dos seguintes anticorpos: anti-nitrotirosina (1:500, Santa Cruz) por 1h a 4°C. Entre a incubação do anticorpo primário com o secundário e após a incubação do secundário, as lâminas foram lavadas por 30 minutos com PBS 1x (6 vezes de 5 min). As lâminas foram observadas usando o microscópio confocal Zeiss LSM 510 Meta (CAPI, ICB, UFMG). A análise de fluorescência foi realizada usando o software ImageJ.

#### **4.11. Extração de RNA , transcrição reversa e PCR em tempo**

Após o isolamento dos cardiomiócitos (descrito no ítem 4.3) o RNA total dessas células foi extraído utilizando o reagente Trizol (Invitrogen) através do método desenvolvido por Chomczynski e Sacchi 1987. Em seguida foi adicionado 200 µl de clorofórmio ao homogeneizado. O complexo formado foi incubado por 5 minutos a 37°C e posteriormente centrifugados por 15 minutos a 4°C e 13.500 rpm. Após a centrifugação foram formadas 3 camadas. A fase superior correspondente ao RNA foi coletada e transferida para outro eppendorf. A esse novo eppendorf foi adicionado de 500 µl de álcool isopropílico que permaneceu incubado por 15 min a 37°C seguido por uma nova centrifugação de 15 minutos a 4°C e 13.500 rpm. O sobrenadante obtido foi retirado e descartado, o *pellet* de RNA foi então lavado por 2 vezes com etanol 70% e centrifugado. Após as lavagens o eppendorf foi deixado por 1 hora de ponta a cabeça para a completa secagem do RNA. Posteriormente o RNA foi ressuspendido em água tratada com DEPC (dietilpirocarbonato), mantido por 15 minutos a uma temperatura de 65 °C e por ultimo incubado por 10 minutos a 4°C.

O RNA obtido foi quantificado por espectrofotometria nos comprimentos de ondas de 260 e 280 nm e armazenado a -80°C. A concentração do RNA foi estimada por absorvância óptica pela fórmula:  $[RNA] \mu g/\mu l = (A_{260} \times 40/1000)$ , onde f é o fator de diluição e 40 é o fator de conversão. Contaminantes de DNA foram removidos com adição de DNase I (Ambion Inc., Austin, TX) e a integridade do RNA total verificada através de um gel de agarose corado com 10 % de SYBR safe DNA Gel Stain (invitrogen).

Utilizou-se dois µg de RNA total como moldes para a síntese de cDNA na presença de 50 ng de iniciadores randômicos (*random primers*), 200 U de M-MLV RT (Revert AID TM H *Minus Moloney murine leukemia virus-reverse transcriptase*,

Fermentas Inc., Hanover, MD, USA), 200 U  $\mu$ l Rnase Out (Fermentas Inc., Hanover, MD, USA), 0,5 mM de dNTPs, 2,5 mM de MgCl<sub>2</sub>, 1 X de tampão da M-MLV RT em um volume final de 20  $\mu$ l. O ciclo usado na reação foi de: 10 minutos a 20°C, 45 minutos a 42°C, 5 minutos a 95°C e 10 minutos a 4°C. Foi usado o termociclador PTC-100TM, MJ Research, INC.

A primeira fita de cDNA foi sintetizada usando o High Capacity cDNA Transcription Kit (Applied Biosystems, CA, USA), de acordo com as recomendações do fabricante. Depois da transcrição reversa, o cDNA foi submetido ao Rotor-Gene 6000 Real-Time Rotary Analyzer (Corbett Robotics Inc., San Francisco, USA) usando *Power SYBR Green Master Mix* (Biosystems, CA, USA). Para a reação foi usado um volume final de 20 $\mu$ l, contendo 0.5  $\mu$ M de iniciador (*primer*), 10 $\mu$ l of *Power SYBR Green Máster Mix 2X* e 1 $\mu$ l de cDNA. As reações passaram por 45 ciclos depois da desnaturação inicial (95°C por 2 minutos) com os seguintes parâmetros: 95°C (desnaturação), 15s; 60°C (anelamento e extensão), 60s (Resende e cols., 2007; Resende e cols., 2008). Para cada experimento, a reação sem cDNA foi usada como controle negativo. Em adição, a ausência de contaminantes de DNA foi calculada em amostras de RT negativo. As análises da curva de dissociação dos produtos da PCR foram obtidas aquecendo as amostras de 60°C a 95°C a 0.1°C/s, afim de avaliar a especificidade dos iniciadores. A quantificação relativa da expressão gênica foi feita usando o método  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ , como descrito abaixo, os dados foram normalizados pela expressão gênica de  $\beta$  actina. Foram obtidos produtos de PCR com menos de 100 pares de bases de comprimento. Os *primers* foram sintetizados pela DNA Technologies, Coralville, IA. Para a realização de PCRs em cardiomiócitos foram utilizados os *primers* para os genes de interesse listados na tabela 1.

A quantificação da amplificação gênica foi realizada pela determinação do limiar de ciclos (*cycle threshold*, CT) baseado na fluorescência detectada dentro da região geométrica da curva semi-log do perfil de amplificação. Um perfil de amplificação para cada amostra foi gerado demonstrando o aumento na fluorescência do corante indicador (*reporter dye fluorescence*, Rn) para cada ciclo da PCR. De cada perfil de amplificação um valor de limiar do ciclo foi calculado, representando o número do ciclo da PCR em que a fluorescência foi detectada acima de um limiar arbitrário, com base na variabilidade das linhas de base dos quinze primeiros ciclos. A quantificação relativa da expressão do gene alvo foi avaliada usando o método comparativo do CT como descrito previamente (Medhurst e cols., 2000). O valor de  $\Delta$ CT foi determinado pela subtração do CT de cada amostra do valor do CT da  $\Delta$ -actina, respectiva para cada amostra usada como controle interno. O cálculo do  $\Delta$ CT



envolve o uso da média do  $\Delta CT$  do grupo controle como uma constante arbitrária para subtrair de todos os outros valores médios de  $\Delta CT$ . As mudanças na expressão gênica do gene de interesse são equivalentes a  $2^{-\Delta CT}$ . Os valores foram analisados pela ANOVA seguida pela comparação pareada do teste de Tukey (Tukey's HSD test), com nível de significância de 5%.

**Tabela 1: Seqüência dos *primers* utilizados na realização de PCRs em miócitos ventriculares. PRIMER 5'-3' Reversa 5'-3'.**

PRIMER	5'-3'	Reversa 5'-3'
ANP	GGATTTCAAGAACCTGCTAGA	CTTCATCGGTCTGCTCGCTCA
$\beta$ -MHC	CTCCAACATGGAGCAGATCA	GCTCCGGTGCTCATTCA
MR	TCCAAAGGATGGCCTCAAAA	ATCTTTCTCAGCTCCTTGATGTAATTT
GR	ACTGCCCCAAGTGAAAACAGA	GCCCAGTTTCTCCTGCTTAATTAC

ANP: Peptídeo Natriurético Atrial,  $\beta$ -MHC: Miosina de Cadeia Pesada; MR: Receptor de Mineralocorticoide GR: Receptor de Glicocorticoide.

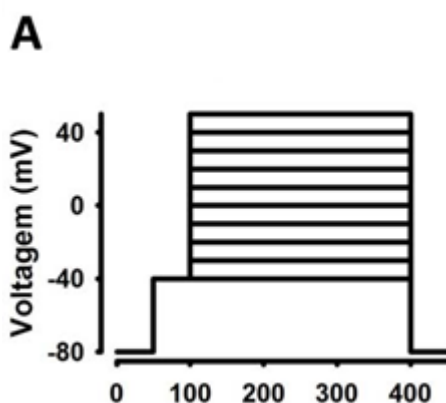
## 4.12. Eletrofisiologia celular

### 4.12.1 Técnica *whole-cell patch clamp*

Um amplificador EPC 9.2 (HEKA Instruments, Germany) foi utilizado para estudar os parâmetros eletrofisiológicos de células ventriculares cardíacas isoladas. Todas as medidas foram realizadas utilizando-se as configurações '*whole-cell voltage-clamp*', para medir as correntes totais de membrana de acordo com Roman-Campos e cols., (2010). Para todos os experimentos com eletrofisiologia, após a obtenção da configuração *whole-cell*, foram esperados cerca de 3-5 minutos para permitir o equilíbrio entre solução de pipeta e citoplasma. As pipetas utilizadas nos experimentos possuíam resistência entre 0,5-2 M $\Omega$ . Todas as correntes foram filtradas passa-baixa com frequência de corte de 2.9 kHz. A capacitância celular foi obtida com compensação eletrônica e o transiente capacitivo compensado eletronicamente. (40 a 70%).

#### 4.12.2 Medida da corrente de cálcio tipo L ( $I_{Ca,L}$ )

Para medir a corrente de cálcio do tipo L ( $I_{Ca,L}$ ) foi utilizada solução interna (mM): 120 CsCl, 20 TEA-Cl, 5 NaCl, 10 Hepes, 5 EGTA, pH 7.2, ajustado com CsOH, sendo a solução externa Tyrode.  $I_{Ca}$  foi medida entre os potenciais de -40 a 50 mV, tendo o pulso a duração de 300 ms, com incrementos de 10 mV, partindo-se de um potencial de membrana de -80 mV. Um pré-pulso de 50 ms de duração, partindo do potencial de membrana a -40 mV foi aplicado para inativar a corrente de sódio ( $I_{Na}$ ) (figura 8). A aquisição dos dados foi realizada com freqüência entre pulsos de 0.1 Hz e freqüência de aquisição a 10 kHz. Cardiomiócitos foram pré-incubados (30-60 min) com aldosterona na concentração de 1  $\mu$ mol/L e/ou Ang-(1-7) na concentração de 100 nmol/L.



**Figura 8: Protocolo para eletrofisiologia.** (A) Protocolo para obtenção das  $I_{Ca,L}$ . Partindo-se de um potencial de membrana de -80 mV, é aplicado um pré-pulso a -40 mV, de 50 ms de duração, com posterior incrementos de 10 mV até 50 mV, com pulso de duração de 300 ms. Em todos os protocolos de whole cell voltage clamp, ao final do pulso o potencial retorna para o seu respectivo potencial de repouso.

#### 4.12.3 Análise biofísica das correntes iônicas

Todas as correntes iônicas foram analisadas em termos de valor absoluto máximo normalizado pela capacitância celular. As relações de densidade de corrente foram ajustadas com a seguinte equação:

$$I_V = G_{\max} * \frac{(V_m - E_{Ca})}{1 + \exp(V_m - V_{0.5})/S}$$

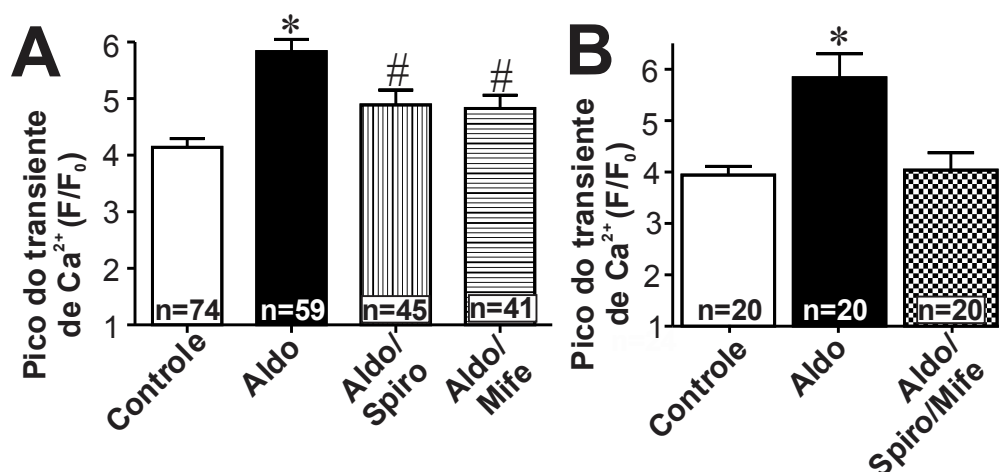
onde, condutância,  $G_{\max}$  máxima;  $V_m$ , potencial de membrana;  $E_{Ca}$ , equilíbrio potencial eletroquímico;  $V_{0.5}$ , o potencial de onde 50% de canais iônicos são ativados; fator de inclinação  $S$ .

#### **4.13 Análise estatística**

Os resultados foram analisados quanto à sua significância por meio do teste *T* e teste *One-Way ANOVA*, seguido pelo pós-teste por *Bonferroni* sendo considerados significativos quando  $*P < 0,05$  e apresentados como Média +/- erro da padrão média.

## 5. RESULTADOS

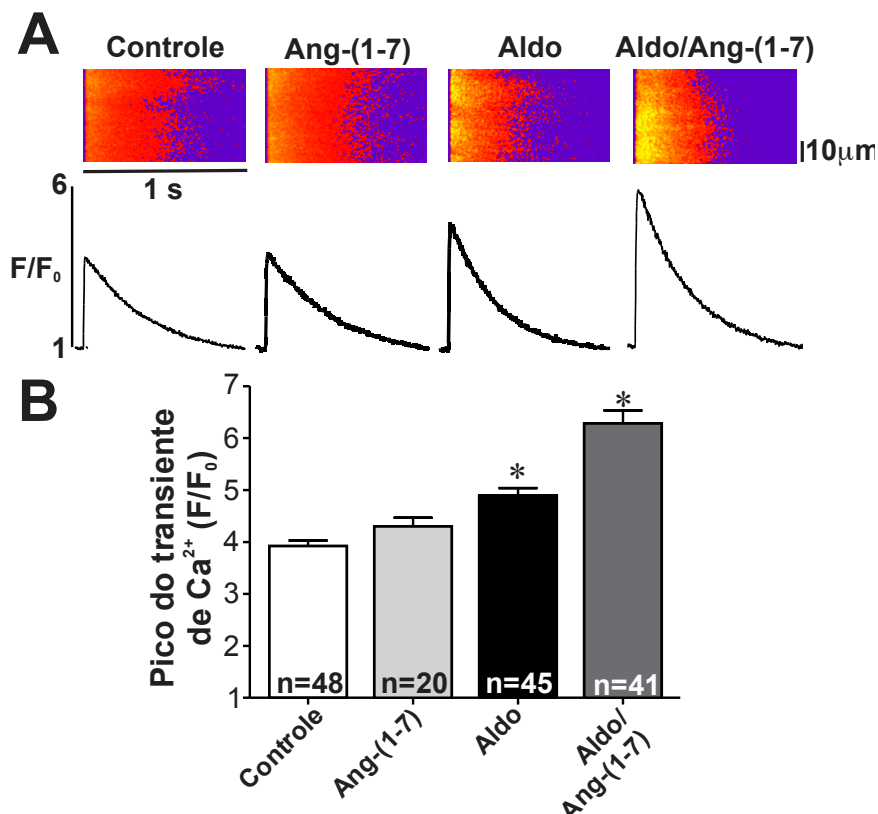
Em miócitos ventriculares o aumento global e transitório de  $[Ca^{2+}]_i$  é essencial para a função cardíaca: este aumento é subjacente à contração e contribui para a regulação da atividade elétrica (Guatimosim e cols., 2002). Para investigar diretamente os efeitos agudos do tratamento com aldosterona sobre os parâmetros que envolvem o transiente de  $Ca^{2+}$ , miócitos ventriculares foram incubados com uma sonda fluorescente sensível ao  $Ca^{2+}$  Flúor-4/AM, e posteriormente visualizados através da microscopia confocal. Aqui, usamos uma concentração suprafisiológica de aldosterona ( $1\mu\text{mol/L}$ ) para ativar tanto o receptor de mineralocorticóide (MR) quanto o receptor de glicocorticóide (GR) de forma redox independente, como já havia sido demonstrado anteriormente (Rossier e cols., 2010). Tratamento de cardiomiócitos com a aldosterona levou a um aumento significativo da amplitude do transiente  $Ca^{2+}$  quando comparado com células não tratadas, esse efeito foi parcialmente abolido através da pré-incubação com espironolactona, o antagonista de MR ( $10\mu\text{mol/L}$ ; Figura 9A). A incubação de cardiomiócitos com mifepristona ( $10\mu\text{mol/L}$ ), um antagonista do GR, também preveniu parcialmente o aumento da amplitude do transiente de  $Ca^{2+}$  desencadeado pelo tratamento com aldosterona (Figura 9A). Finalmente, combinando os dois antagonistas (espironolactona, MR) e (mifepristona, GR), tivemos uma completa inibição do aumento do pico do transiente de  $Ca^{2+}$ , observado em miócitos ventriculares tratados com aldosterona (Figura 9B). Tomados em conjunto, estes dados validaram a utilização de concentrações suprafisiológicas de aldosterona para ativar MR e GR, como previamente demonstrado por Rossier e cols. (2008).



**Figura 9: Aldosterona aumenta a magnitude do transiente de  $Ca^{2+}$  em cardiomiócitos.** Concentrações suprafisiológicas de aldosterona ativam ambos os receptores MR e GR. **A-B.** Gráfico de barras mostrando o efeito da aldosterona e de seus antagonistas na amplitude do

transiente de  $\text{Ca}^{2+}$ . \* $p < 0.05$  quando comparado com os outros grupos. #  $p < 0.05$  quando comparado ao controle e ao grupo tratado com aldosterona. n= número de células

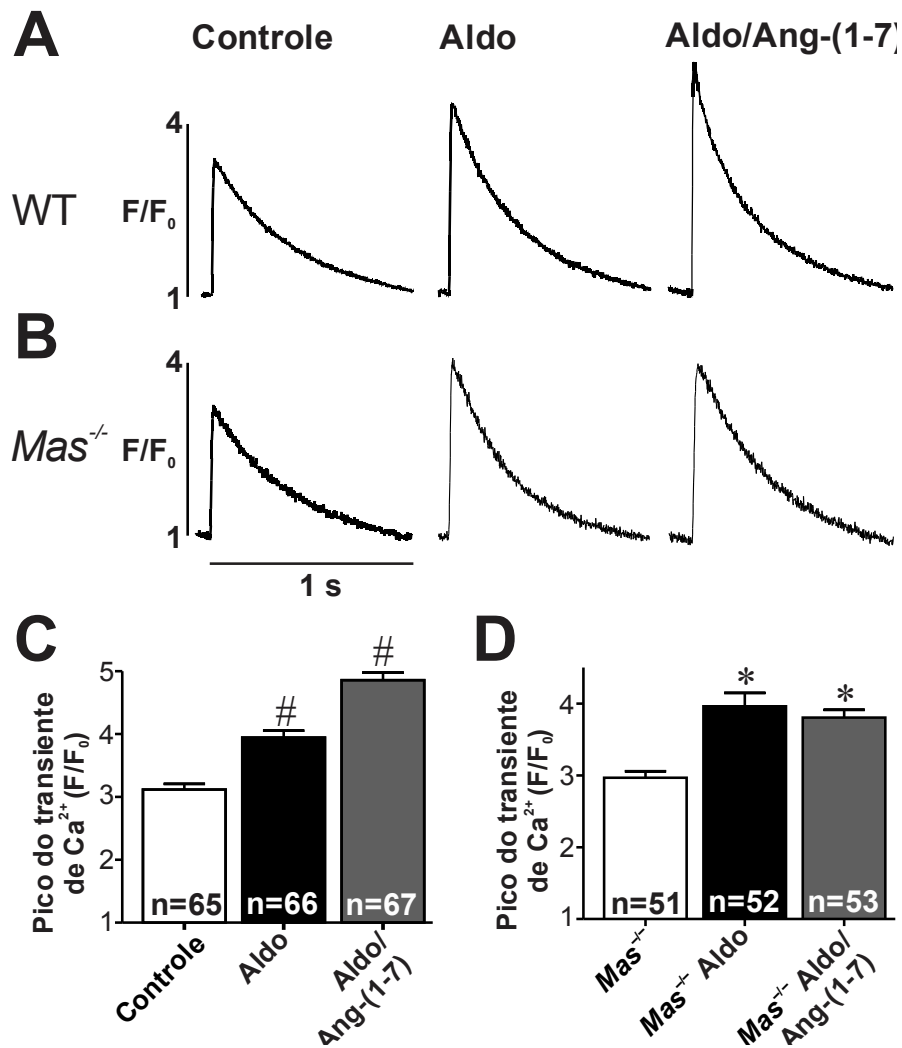
Na figura 10 investigamos o efeito da Ang-(1-7) nos níveis globais de  $\text{Ca}^{2+}$  em condições de ativação de ambos os receptores de mineralocorticóides e glicocorticóides, pela aldosterona. Painéis superiores da Figura 10A mostram imagens representativas do perfil do transiente de  $\text{Ca}^{2+}$  obtidas através da microscopia confocal em cardiomiócitos ventriculares. Abaixo, temos uma representação gráfica do perfil do transiente de cálcio. Como demonstrado anteriormente por Dias-Peixoto e cols. (2008), o tratamento com Ang-(1-7) (100 nmol/L) não apresentou efeito sobre a amplitude do transiente de  $\text{Ca}^{2+}$  (Figura 10B). Já cardiomiócitos tratados com aldosterona (1  $\mu\text{M}$ ) apresentaram um aumento significativo do transiente de  $\text{Ca}^{2+}$ . De maneira inesperada e surpreendente, a adição de Ang-(1-7) em células tratadas com aldosterona aumentou ainda mais a magnitude do transiente de  $\text{Ca}^{2+}$ , 25% acima dos níveis observados em células expostas ao tratamento apenas com aldosterona (Figura 10A e 10B).



**Figura 10: Cross-talk entre aldosterona e Ang-(1-7) aumenta o transiente de  $\text{Ca}^{2+}$  em miócitos ventriculares.** A. Painel superior, imagens representativas dos transientes de  $\text{Ca}^{2+}$  gravados á partir de células controle e tratadas com Ang-(1-7) (100 nmol/L), aldosterona (1  $\mu\text{mol/L}$ ) ou uma combinação de aldosterona e Ang-(1-7). Painel inferior, perfil do transiente de

Ca<sup>2+</sup>. **B.** Gráfico de barras mostrando o efeito sinérgico entre as vias de sinalização da aldosterona e Ang-(1-7) na amplitude do transiente Ca<sup>2+</sup> em cardiomiócitos. \* p<0,05 quando comparado com os outros grupos experimentais. n = número de células.

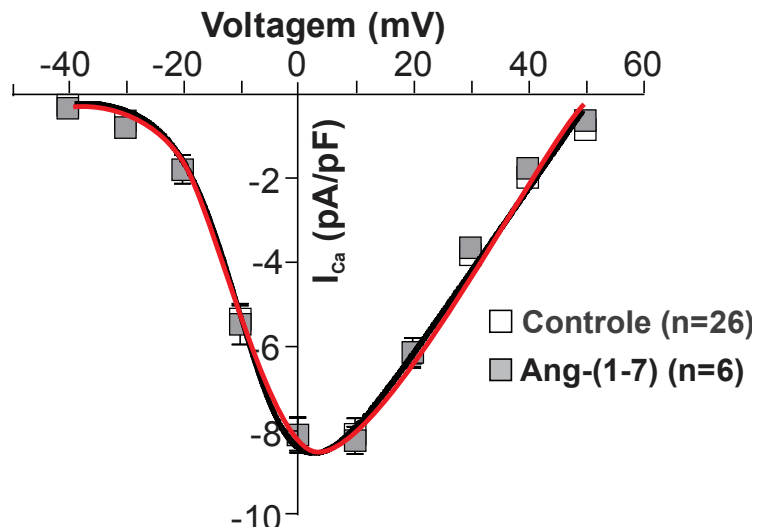
Em conjunto, estes achados sugerem um efeito sinérgico considerável entre aldosterona e Ang-(1-7) em miócitos ventriculares, demonstrando um papel importante de Ang-(1-7) na modulação do Ca<sup>2+</sup> intracelular, em condições onde ocorre um aumento da sinalização mediada pela aldosterona. Para investigar o papel do receptor Mas nos efeitos da Ang-(1-7) sobre o transiente de Ca<sup>2+</sup> em cardiomiócitos tratados com aldosterona, foi feito o isolamento de miócitos ventriculares de camundongos selvagens e nocaute para o receptor Mas (*Mas*<sup>-/-</sup>). Confirmando nossos achados prévios, foi demonstrado que a aldosterona aumenta significativamente o pico do transiente de Ca<sup>2+</sup> em miócitos de camundongos selvagens, um efeito que foi exacerbado na presença de Ang-(1-7) (Figura 11A e 11C). De maneira oposta, miócitos ventriculares de camundongos *Mas*<sup>-/-</sup> não apresentaram tal efeito sinérgico na magnitude do transiente de Ca<sup>2+</sup> na presença de Ang-(1-7) em células tratadas com aldosterona (Figura 11B e 11D), sugerindo um papel importante do receptor Mas nas ações da Ang-(1-7) na presença de aldosterona.



**Figura 11: Os efeitos da Ang-(1-7) no transiente de  $Ca^{2+}$  em células tratadas com aldosterona são mediados pelo receptor Mas.** Perfil do transiente de  $Ca^{2+}$  em cardiomiócitos de animais selvagens (**A**) e  $Mas^{-/-}$  (**B**). **C-D.** Gráfico de barras mostrando que os efeitos da Ang-(1-7) no transiente  $Ca^{2+}$  em miócitos tratados com aldosterona são mediados pelo receptor Mas. n= número de células analisadas. # $p < 0.05$  quando comparados com outros grupos. \* $p < 0.05$  quando comparados com células não tratadas de animais  $Mas^{-/-}$ .

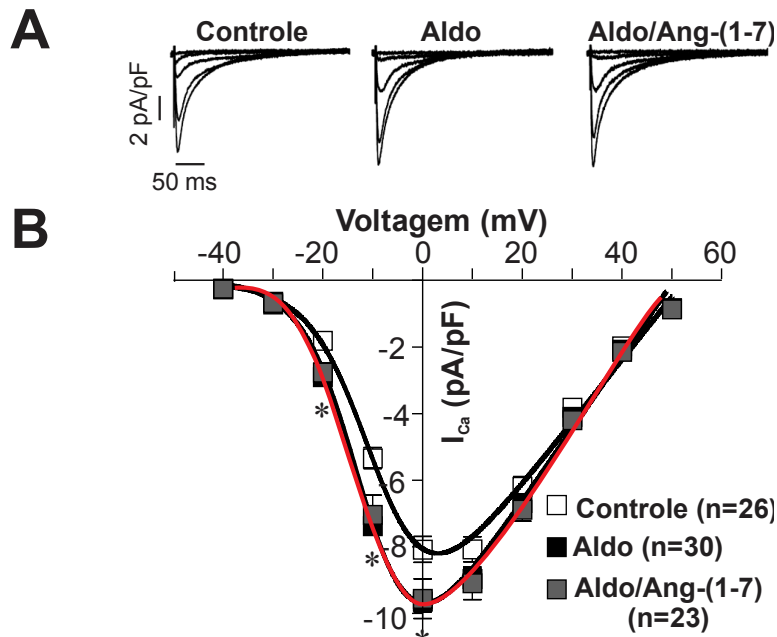
Para investigar as bases celulares envolvidas no efeito da Ang-(1-7) no transiente de cálcio na presença da aldosterona, decidimos avaliar pontos-chaves na maquinaria de  $Ca^{2+}$  nos cardiomiócitos. O primeiro ponto avaliado foi a corrente de  $Ca^{2+}$  tipo L, um importante determinante do influxo de  $Ca^{2+}$  para o interior celular e desta forma contribuiu de sobremaneira para o transiente de cálcio. Como mostrado na figura 12, células incubadas apenas com Ang-(1-7) não apresentaram nenhum efeito sobre a densidade da corrente de  $Ca^{2+}$  tipo L.





**Figura 12: Ang-(1-7) não altera  $I_{Ca,L}$  em miócitos ventriculares.** Relações das médias corrente-voltagem (IV) para a densidade de corrente  $I_{Ca,L}$  gravadas de células controle e tratadas com Ang-(1-7). n=número de células analisadas.

De maneira oposta, o tratamento com aldosterona de miócitos ventriculares foi responsável por aumentar significativamente a densidade da corrente de  $Ca^{2+}$  tipo L, quando comparado a cardiomiócitos não tratados (em 0mV;  $8,1 \pm 0,4$  pA/pF em 26 células controles versus  $9,6 \pm 0,3$  pA/pF em células tratadas com aldosterona,  $p < 0.05$ ); (Figura 13A e 13B), como previamente demonstrado por Bénitah e cols., (1999).



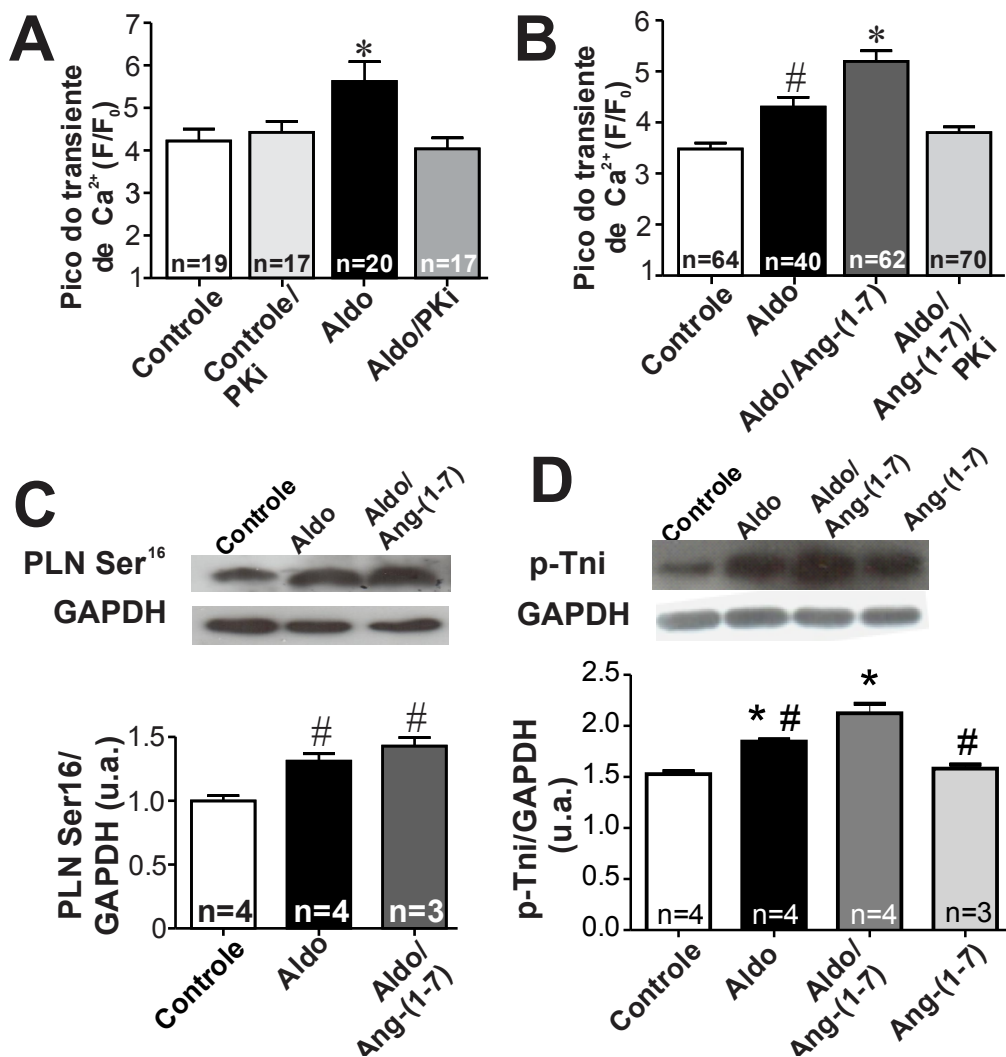
**Figura 13: Aldosterona aumenta  $I_{Ca,L}$  em miócitos ventriculares.** **A.** Amostra de correntes  $I_{Ca,L}$  gravadas a partir de despolarizações de -40 a 0 mV durante 300 ms. Aldosterona (1  $\mu\text{mol/L}$ ) aumentou significativamente a magnitude da  $I_{Ca,L}$  em células controles, um efeito que não foi alterado pela incubação concomitante com Ang-(1-7) na concentração de 100 nmol/L. **B.** Relações das médias I-V para  $I_{Ca,L}$  registrada nos grupos controle, aldosterona e aldosterona/Ang-(1-7). \*  $p < 0,05$  quando comparado com o controle. n = número de células.

É importante ressaltar que esse efeito da aldosterona na corrente de  $\text{Ca}^{2+}$  não foi alterado na presença de Ang-(1-7). A partir destes dados podemos destacar dois aspectos importantes para esses achados. Em primeiro lugar, o aumento da densidade da corrente de  $\text{Ca}^{2+}$  pode explicar os efeitos da aldosterona no transiente de  $\text{Ca}^{2+}$ , em segundo lugar, o efeito sinérgico observado na presença de aldo/Ang-(1-7) não foi visualizado na densidade da corrente de  $\text{Ca}^{2+}$ , tipo L, indicando assim que outros fatores poderiam contribuir para os efeitos dessas duas moléculas na magnitude do transiente de  $\text{Ca}^{2+}$ .

Na figura 14 avaliamos as alterações moleculares que podem ser determinantes para a modulação da sinalização de  $\text{Ca}^{2+}$  observadas em resposta ao tratamento com aldosterona/Ang-(1-7). Primeiramente, decidiu-se investigar se a proteína quinase A (PKA), um alvo conhecido do monofosfato de adenosina cíclico (AMP cíclico), é um mediador que pode estar "downstream" aos efeitos desencadeados pela aldosterona. Como apresentado na figura 14A, PKi, um inibidor da PKA, aboliu os efeitos da aldosterona na amplitude do transiente de  $\text{Ca}^{2+}$ . Sendo assim, concluímos que a aldosterona altera o transiente global de  $\text{Ca}^{2+}$  através da

ativação da PKA. Importante notar, que o inibidor da PKA reduziu significativamente a amplitude do pico do transiente de  $\text{Ca}^{2+}$  em células tratadas com aldosterona e Ang-(1-7) (Figura 14B), indicando que a ativação da PKA desempenha um papel importante nesse *cross-talk*.

A PKA tem como um de seus alvos a fosfolamban (PLN), uma proteína que regula a atividade da SERCA2A por aumentar sua fosforilação no sítio da serina<sup>16</sup> (Ser<sup>16</sup>). A defosforilação da PLN inibe a atividade da SERCA2A, ao passo que a sua fosforilação reverte esta inibição, aumentando assim a recaptação de  $\text{Ca}^{2+}$  para o RS. Aqui vale ressaltar que o aumento da concentração de cálcio no retículo sarcoplasmático pode explicar o aumento da magnitude do transiente de cálcio. A Figura 14C mostra um aumento significativo da fosforilação da PLN Ser<sup>16</sup>, no sítio da PKA, induzido pela aldosterona. Efeito semelhante foi observado em cardiomiócitos expostos ao tratamento conjunto com aldosterona/Ang-(1-7). Assim, estes dados sugerem que a atividade da SERCA2A esteja aumentada em células tratadas com aldosterona combinadas ou não com Ang-(1-7). Outro alvo bem descrito da PKA é a TnI (Li, e cols., 2000) que uma vez fosforilada apresenta menor afinidade ao cálcio no complexo actina-miosina. Como consequência ocorre aceleração da contração e do relaxamento miocárdico. Nosso próximo passo então foi avaliar a fosforilação da troponina I nos diferentes grupos experimentais. Foi observado que o tratamento em conjunto com aldosterona/Ang-(1-7) foi capaz de aumentar ainda mais a fosforilação da pTnI (Figura 14D), o que pode favorecer o relaxamento por interferir na sensibilidade do miofilamento ao cálcio.



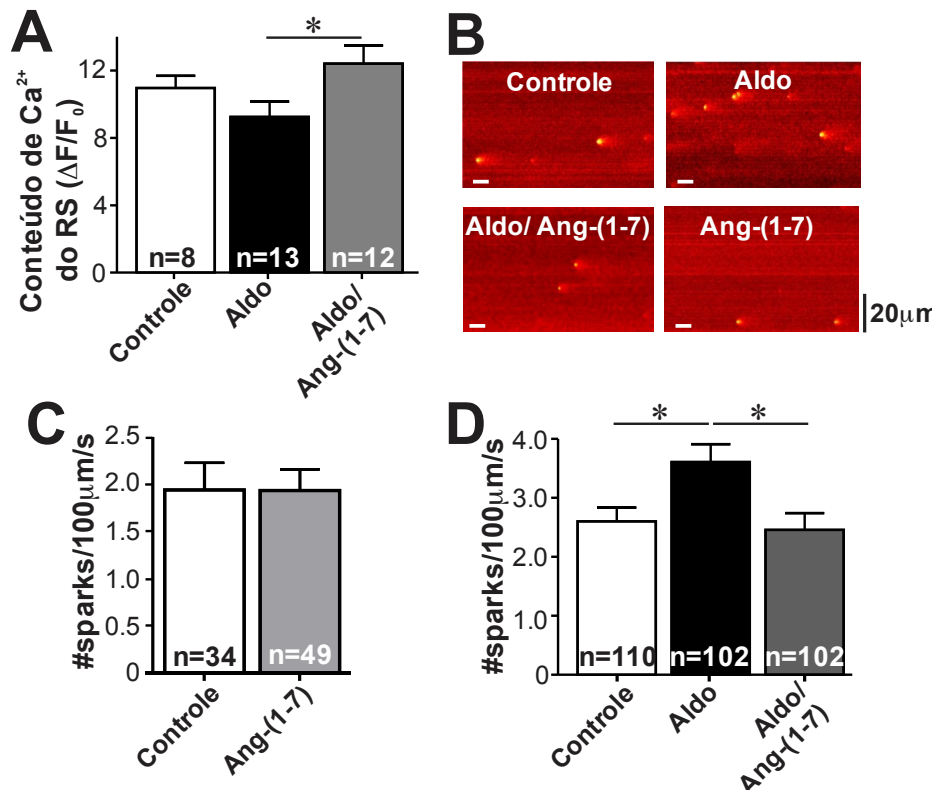
**Figura 14: PKA é um mediador dos efeitos sinérgicos da aldosterona e Ang-(1-7) no transiente de  $Ca^{2+}$ .** **A.** Cardiomiócitos foram pré-incubados com 10 nmol/L de PKi e, em seguida, tratados com 1  $\mu$ mol/L de aldosterona, na presença contínua de PKi por 30 min. O tratamento com PKi aboliu completamente o efeito da aldosterona no pico do transiente de  $Ca^{2+}$ . **B.** PKi previniu significativamente o aumento da magnitude do transiente  $Ca^{2+}$  induzido pelo tratamento conjunto com aldosterona e Ang-(1-7). **C.** Os níveis de fosforilação da PLN Ser<sup>16</sup> estão aumentados em cardiomiócitos expostos a aldosterona independentemente da adição de Ang-(1-7). A-C \*p <0,05 quando comparado com os outros grupos. # p <0,05 quando comparado com o controle. n = número de células. **D.** Os níveis de fosforilação da Tni estão aumentados em cardiomiócitos expostos a aldosterona. Incubação de cardiomiócitos com Ang-(1-7) e aldosterona induz um aumento ainda maior na fosforilação da Tni. \*p <0,05 quando comparado com o controle. # p <0,05 quando comparado com grupo aldo/(Ang-1-7). n = número de células.

Assim, estes dados sugerem que a atividade da SERCA2A está aumentada em células tratadas com aldosterona combinadas ou não com Ang-(1-7).

Sendo assim, nosso próximo passo foi investigar os mecanismos celulares subjacentes a Ang-(1-7) que interferem no aumento da magnitude do transiente de  $\text{Ca}^{2+}$  em condições suprafisiológicas de aldosterona. Sabe-se que alterações no conteúdo de  $\text{Ca}^{2+}$  do RS podem contribuir para o aumento da liberação de  $\text{Ca}^{2+}$  em miócitos ventriculares. A fim de investigar essa possível contribuição, foi realizado o registro do conteúdo de  $\text{Ca}^{2+}$  do retículo sarcoplasmático (RS), adicionando-se aos miócitos ventriculares uma carga de cafeína. A cafeína é responsável por ativar os receptores de rianodina a fim de que os mesmos liberem  $\text{Ca}^{2+}$  do RS.

Na figura 15A mostramos que o conteúdo de  $\text{Ca}^{2+}$  do RS não apresentou diferença entre cardiomiócitos do grupo controle e tratados com aldosterona. No entanto, deve-se notar uma tendência na redução do conteúdo de  $\text{Ca}^{2+}$  do RS em miócitos tratados com aldosterona. É importante ressaltar que a incubação concomitante com Ang-(1-7) induziu aumento significativo do conteúdo de  $\text{Ca}^{2+}$  do RS (aproximadamente 34%), quando comparado com o grupo de células tratadas apenas com aldosterona.

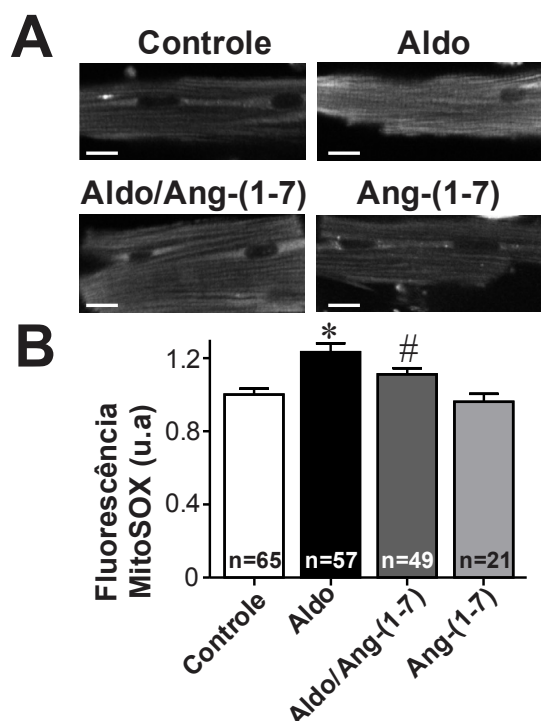
O conteúdo de  $\text{Ca}^{2+}$  do RS reflete o balanço entre o  $\text{Ca}^{2+}$  que é recaptado para dentro do RS via ATPase de  $\text{Ca}^{2+}$  (SERCA2A) e efluxo deste via receptor de rianodina (RyR). Com o objetivo de investigar o mecanismo pelo qual Ang-(1-7) promove um aumento do conteúdo do RS em cardiomiócitos tratados com aldosterona resolveu-se avaliar a atividade do receptor de RyR, através da medida indireta, avaliando-se a frequência das *sparks* de  $\text{Ca}^{2+}$ . Imagens representativas de *sparks* de  $\text{Ca}^{2+}$  em repouso são apresentadas na Figura 15B. O tratamento de cardiomiócitos com Ang-(1-7) não teve qualquer efeito sobre a frequência das *sparks* de  $\text{Ca}^{2+}$  (Figura 15C), ao passo que o tratamento com aldosterona é responsável por aumentar significativamente a taxa de *sparks* de  $\text{Ca}^{2+}$  (Figura 15D). A adição de Ang-(1-7) a células tratadas com aldosterona preveniu consideravelmente o aumento da taxa de *sparks* de  $\text{Ca}^{2+}$  (Figura 15 D) induzida pela aldosterona. Concluí-se, portanto, que ao reduzir a taxa de *sparks*, a Ang-(1-7) contribui para o aumento no conteúdo de  $\text{Ca}^{2+}$  do RS, aumentando assim a magnitude do transiente de  $\text{Ca}^{2+}$  nessas células.



**Figura 15: Ang(1-7) previne o aumento da taxa Sparks de Ca<sup>2+</sup> em cardiomiócitos tratados com aldosterona.** **A.** O conteúdo de Ca<sup>2+</sup> do RS não apresentou diferença entre as células controle e as tratadas com aldosterona. **B.** Sparks de Ca<sup>2+</sup> representativas gravadas em células em repouso. Barra=100 ms. **C.** Ang(1-7) sozinha não modula a taxa de ocorrência das sparks de Ca<sup>2+</sup>. **D.** Ang(1-7) previne o aumento significativamente a taxa das sparks de Ca<sup>2+</sup> em miócitos tratados com aldosterona. n= número de células. \*p<0.05.

Alteração no equilíbrio fisiológico entre ON e EROS está envolvida de maneira crítica no desenvolvimento de doenças cardiovasculares. Recentemente foi demonstrado que a aldosterona aumenta os níveis de EROS em miócitos ventriculares, através da ativação da NADPH oxidase (Rossier e cols., 2008). Além do que os receptores de RyR são sensíveis a sinalização redox (Prosser e cols., 2011). A partir disso, decidimos investigar se uma das possíveis ações da Ang(1-7) seria alterar o estado redox da célula. Para isso utilizou-se uma sonda fluorescente MitoSOXRed para detectar a produção EROS mitocondrial. A figura 16A mostra imagens de cardiomiócitos incubados com Mitosox nos diferentes grupos experimentais. Observamos através dos nossos resultados que o tratamento com aldosterona leva a um aumento significativo de EROS mitocondrial o qual foi detectado a partir do aumento da fluorescência do Mitosox, e que o tratamento com Ang(1-7)

preveni parcialmente esse efeito (Figura 16B), sugerindo uma importante ação antioxidante de Ang-(1-7) em células cardíacas.



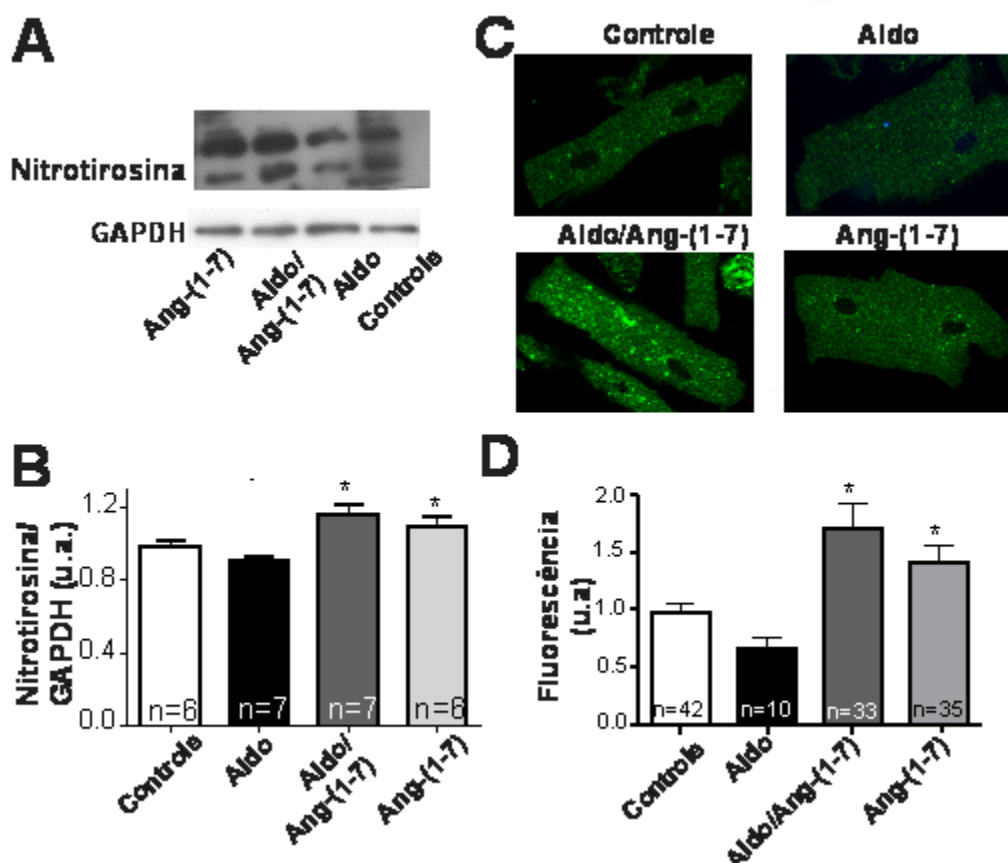
**Figure 16: Ang-(1-7) previne o aumento dos níveis de EROS desencadeado pela aldosterona em cardiomiócitos. A.** Imagens representativas da fluorescência do MitoSOX em miócitos controles, tratados com aldosterona e aldosterona/Ang-(1-7). **B.** A fluorescência do MitoSOX aumentou significativamente na presença de aldosterona (1 $\mu$ mol/L). Ang-(1-7) 100nmol/L levou a uma redução significativa da fluorescência em miócitos tratados com aldosterona. n = número de células analisadas. \*p <0,05 versus os outros grupos, # p<0,05 vs controle.

Sabe-se que o peroxinitrito (ONOO<sup>-</sup>), é produto da reação de óxido nítrico e de ânion superóxido, com papel importante em várias patologias. Essa espécie reativa de oxigênio, exerce efeitos bifásicos sobre a função de cardiomiócitos, de tal modo que baixas concentrações de peróxido de nítrico aumentam (Kohr e cols., 2008a; Paolucci e cols., 2000) e altas concentrações diminuem (Kohr e cols., 2008a; Stojanovic e cols., 2001; Kohr e cols., 2008b) a força de contração.

Para detectar possíveis indicativos de aumento ou diminuição dos níveis de peroxinitrito em células tratadas com aldosterona e Ang-(1-7) utilizamos o anticorpo anti-nitrotirosina em dois experimentos distintos. Primeiramente, foi realizada análise qualitativa com a técnica de imunofluorescência e posterior análise quantitativa através da técnica de western blot. Sabe-se que a nitrotirosina é o produto da nitração de

tirosina mediado por espécies reativas de nitrogênio tais como peroxinitrito e dióxido de nitrogênio. Ela é detectada em algumas condições patológicas (Mohiuddin e cols., 2006) e é considerada uma marcadora de estresse oxidativo dependente de ON.

As figuras 17 A-D mostram que a presença da Ang-(1-7) foi responsável por aumentar tanto a fluorescência quanto a expressão da nitrotirosina em cardiomiócitos tratados ou não com aldosterona .

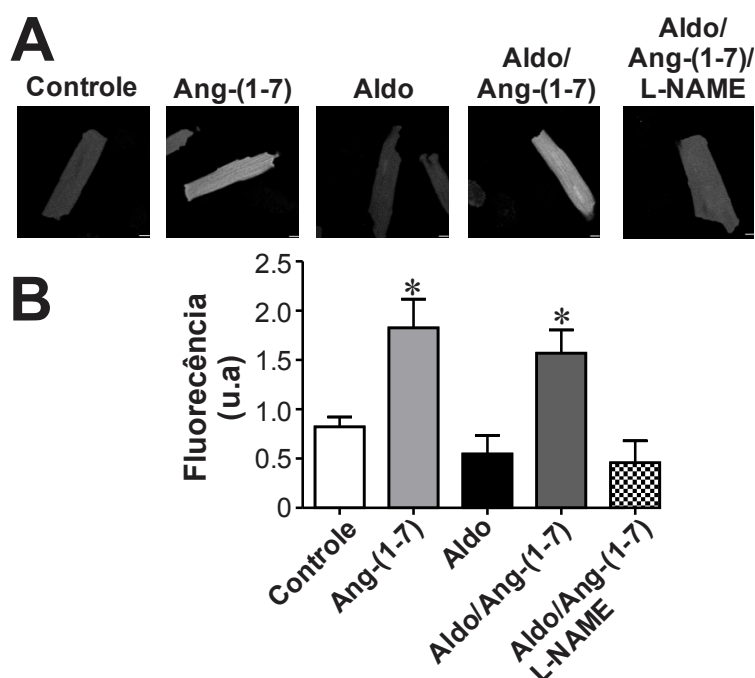


**Figura 17: Ang-(1-7) aumenta os níveis de nitrotirosina em miócitos tratados com aldosterona.** **A.** Blots representativos. **B.** Gráfico de barras mostrando as médias da densitometria dos níveis de nitrotirosina nos diferentes grupos experimentais. (n=número de animais utilizados por grupo). **C.** Imagens representativas da fluorescência de anticopo anti-nitrotirosina em miócitos controles, tratados com aldosterona, aldosterona/Ang-(1-7) e Ang-(1-7). **D.** Gráfico de barras referentes a análise quantitativa dos níveis de nitrotirosina nos diferentes grupos experimentais. n = número de células ou amostras analisadas. \* p < 0,05 versus os grupos controle e tratado com aldosterona.

Sabe-se que o óxido nítrico (ON) é um importante modulador da atividade de proteínas envolvidas na dinâmica do  $Ca^{2+}$ , incluindo o receptor de rianodina (Ziolo e col., 2001). A partir desta informação tentamos estabelecer os mecanismos pelos



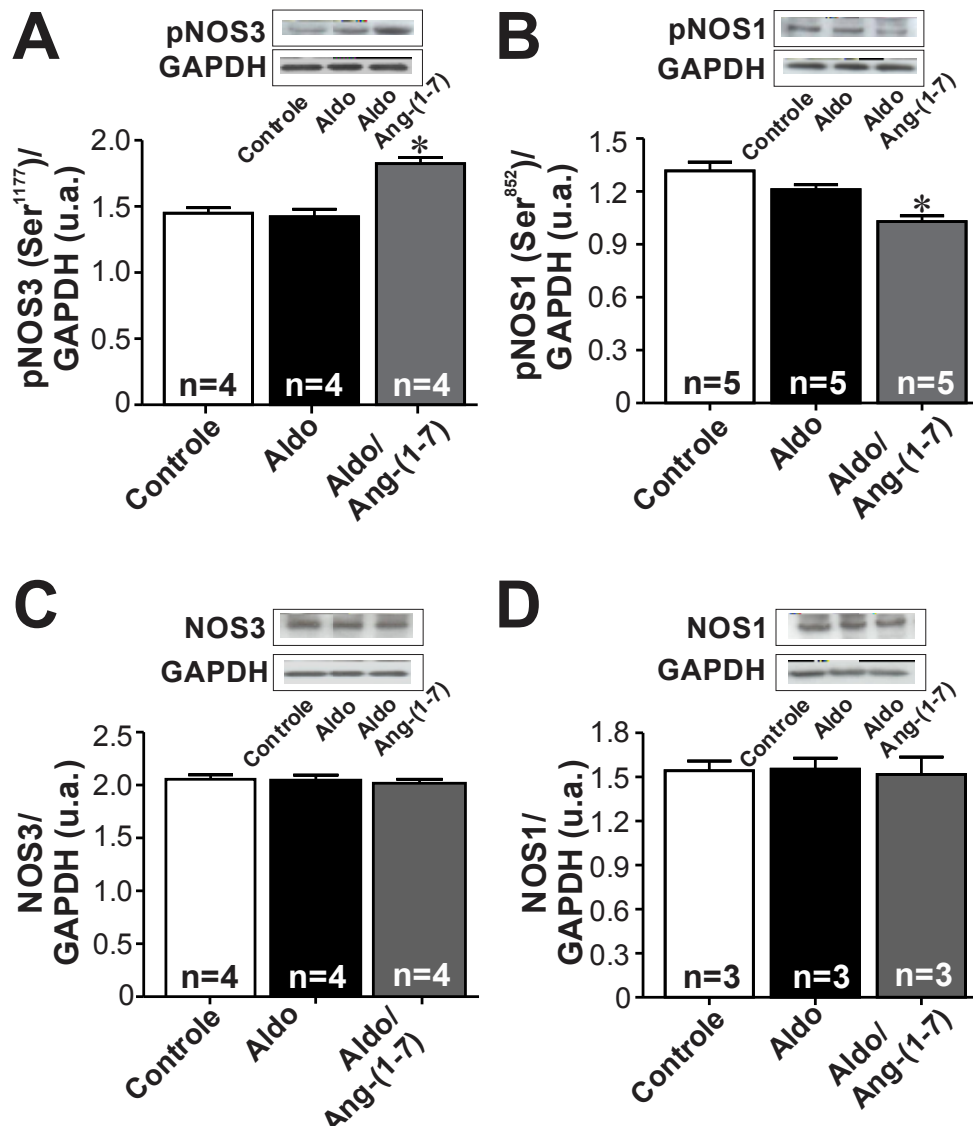
quais a Ang-(1-7) estaria exercendo seus efeitos em células tratadas com aldosterona, uma vez que a Ang-(1-7) é capaz de induzir a produção de ON em células cardíacas. Sendo assim, avaliou-se os níveis de ON utilizando uma sonda fluorescente sensível ao ON, DAF-FM (4-amino-5methylamino2'7'- diaminofluorescein diacetate). Como demonstrado de maneira consistente pelos achados anteriores do nosso grupo (Dias-Peixoto e cols., 2008; Gomes e cols., 2010), o tratamento com Ang-(1-7) (100 nmol/L) levou a um aumento na produção de ON (Fig 18A e 18B). Importante, nossos dados revelam que a produção de ON via Ang-(1-7) não é afetada pelo tratamento com aldosterona, sendo que esta última atuando sozinha não interfere nos níveis de produção de ON em cardiomiócitos. Na Figura 18B mostramos que a produção aumentada de ON pela Ang-(1-7) foi completamente abolida em células pré-incubadas com o inibidor de óxido nítrico sintases, L-NAME (*NG-nitro-L-arginine methyl ester*, 10  $\mu$ mol/L).



**Figura 18: Ang-(1-7) aumenta a liberação de ON em miócitos tratados com aldosterona.**

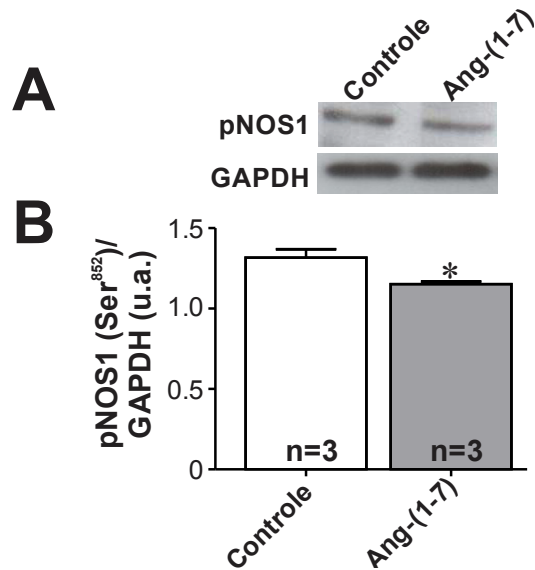
**A.** Imagens representativas de fluorescência do DAF em miócitos ventriculares. Barra = 10  $\mu$ m.  
**B.** Gráfico de barras mostrando a produção de ON após tratamento agudo com Ang-(1-7) (100 nmol/L; 30 minutos) em miócitos ventriculares. O aumento significativo dos níveis de ON pós-incubação com Ang-(1-7) não foi afetado pela aldosterona. Nas células pré-incubadas com L-NAME, o aumento de ON dependente de Ang-(1-7) foi abolida. Aldosterona sozinha, não teve efeito sobre a fluorescência do DAF. n = 20-50 cardiomiócitos por grupo. \*  $p < 0,05$  quando comparado com o grupo controle, tratado com aldosterona, e tratado com aldo/Ang-(1-7) / L-NAME.

Para investigar quais isoformas das ON sintases são ativadas pela Ang-(1-7) em cardiomiócitos tratados com aldosterona, nós realizamos as medidas dos níveis de fosforilação da NOS3 no sítio da serina<sup>1177</sup> (sítio ativador) e NOS1 serina<sup>852</sup> (sítio inibitório), através da técnica de Western blot. Como demonstrado na Figura 19A, o tratamento com aldosterona por si só não afetou a fosforilação da NOS3. Em contrapartida, células tratadas com aldosterona e Ang-(1-7) apresentaram aumento significativo nos níveis de fosforilação da NOS3 na Ser<sup>1177</sup>, confirmando assim nossos achados anteriores (Dias-Peixoto e cols., 2008; Gomes e cols., 2010), nos quais a NOS3 é ativada pela Ang-(1-7), mesmo na presença de aldosterona. A falta de efeito da aldosterona nos níveis de fosforilação da NOS1 também foi observada (Figura 19B). Além disso, houve uma diminuição significativa nos níveis de fosforilação no sítio inibitório (Ser<sup>852</sup>) em cardiomiócitos tratados conjuntamente com aldosterona e Ang-(1-7). Para confirmar se os níveis de expressão de proteína da NOS1 e NOS3 estavam inalterados durante as nossas condições experimentais, medimos a expressão total dessas proteínas. As figuras 19C e 19D nos mostram que os níveis de expressão da NOS1/NOS3 não estavam alterados nas condições experimentais utilizadas.



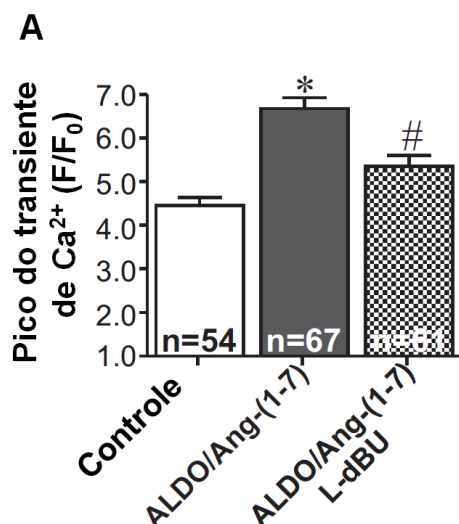
**Figura 19:** Os níveis de fosforilação das isoformas NOS1 e 3 estão alterados nos miócitos ventriculares tratados com aldosterona/Ang-(1-7). **A-B.** Acima, blots representativos. Abaixo, gráfico de barras mostrando a média das análises das densitometrias dos níveis de fosforilação da NOS3 Ser<sup>1177</sup> e NOS1 Ser<sup>852</sup>. \* $p < 0,05$  quando comparado com outros grupos experimentais. **C-D.** Acima, blots representativos. Abaixo, gráfico de barras mostrando médias das análises da densitometria dos níveis totais de NOS3 e NOS1. n= número de amostras de cada grupo de cardiomiócitos.

Vale destacar que o tratamento apenas com Ang-(1-7) levou a uma redução dos níveis de fosforilação da NOS1 Ser<sup>852</sup> mostrando pela primeira vez uma modulação da atividade da NOS1 por esse peptídeo (Figura 20 A-B).



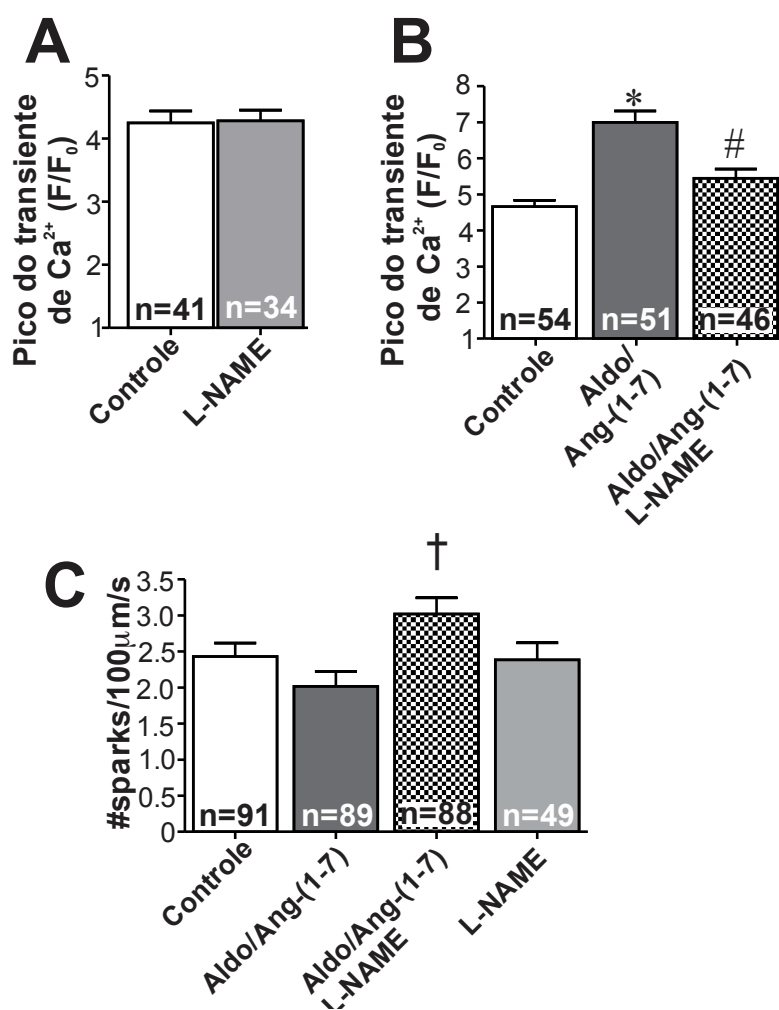
**Figura 20: Ang-(1-7) ativa a NOS1 em cardiomiócitos. A.** Blots representativos. **B.** Gráfico de barras mostrando a média das densitometrias dos níveis de fosforilação da NOS1 no sítio Ser<sup>852</sup> (sítio inibitório). \*p<0.05 quando comparado com o controle. n= número de amostras de cardiomiócitos analisados de cada grupo experimental.

Para confirmar o envolvimento de NOS1 na produção de ON pela Ang- (1-7), as células foram tratadas com o inibidor específico da NOS1 L--ArgNO2-L-Dbu (10µmol /L, L-DBU) (Capetini e cols., 2011). A Inibição de NOS1 com L-Arg NO2-L-Dbu reduziu significativamente o efeito de Ang-(1-7) na amplitude transiente de Ca<sup>2+</sup> em miócitos tratados com aldosterona (Figura 21), confirmando ainda mais o envolvimento da NOS1 nos efeitos da Ang-(1-7) sobre a amplitude do transiente de Ca<sup>2+</sup>, em condições onde a via da aldosterona está ativada nos miócitos ventriculares. Tomados em conjunto, estes dados suportam um papel direto da Ang- (1-7) na produção de ON como um modulador do transiente de Ca<sup>2+</sup> em miócitos tratados com aldosterona, e implica que ambas isoformas NOS1 e NOS3 são fontes de produção de ON derivadas da Ang-(1-7).



**Figura 21:** A Inibição de NOS1 com seu bloqueador específico L-Arg NO<sub>2</sub>-L-Dbu reduziu significativamente o efeito de Ang-(1-7) na amplitude transiente de Ca<sup>2+</sup> em miócitos tratados com aldosterona. Gráfico de barras mostrando o efeito sinérgico entre as vias de sinalização da aldosterona e Ang-(1-7) na amplitude do transiente Ca<sup>2+</sup> em cardiomiócitos e parcialmente bloqueado pelo L-Dbu. \* p<0,05 quando comparado com os outros grupos experimentais. #= p<0.05 quando comparado com grupo controle. n= número de células analisadas de cada grupo experimental.

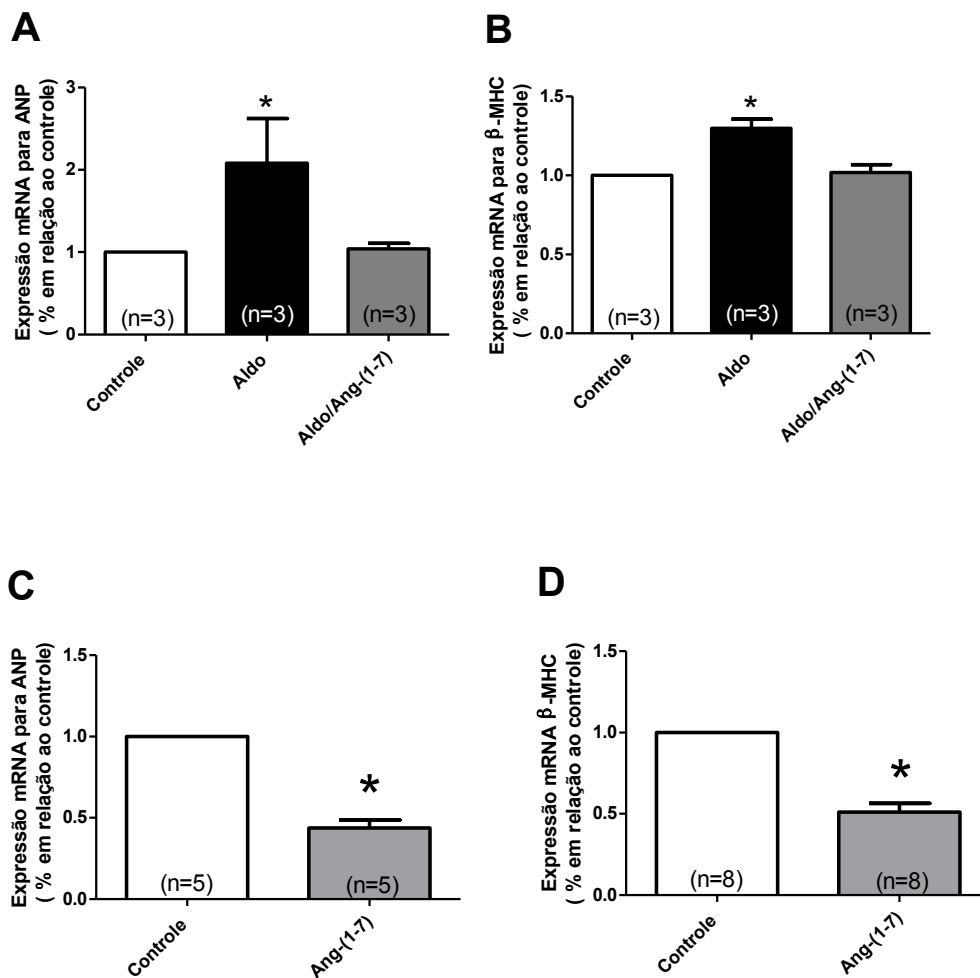
Reduzindo a fosforilação da NOS1 no sítio da serina<sup>852</sup> (sítio inibitório) o que ocorre é um aumento da atividade da enzima sugerindo assim uma maior produção de ON sob estas condições. Para reforçar o fato de que a produção de ON contribui para os efeitos da Ang-(1-7) sobre a dinâmica do Ca<sup>2+</sup> em miócitos tratados com aldosterona, nós avaliamos a amplitude do transiente de Ca<sup>2+</sup> em células tratadas com L-NAME. Embora o L-NAME não apresente qualquer efeito sobre a amplitude do transiente de Ca<sup>2+</sup> quando incubado sozinho (Figura 22A), este reduz significativamente a magnitude do transiente de Ca<sup>2+</sup> em células tratadas com aldosterona e Ang-(1-7) (Figura 22B). Assim estes dados reforçam mais uma vez que o ON participa do *cross-talk* entre aldosterona e Ang-(1-7) contribuindo assim para o aumento significativo da amplitude do transiente de Ca<sup>2+</sup> nestas condições. Sabendo que o tratamento conjunto com aldosterona e Ang-(1-7) em cardiomiócitos ativa a PKA, então é esperado que o L-NAME não reduza completamente o aumento da amplitude de transiente de Ca<sup>2+</sup> observado nesse grupo. A Figura 22C mostra que a pré-incubação com L-NAME em cardiomiócitos tratados com aldosterona e Ang-(1-7) aumentou significativamente a taxa de *sparks* de Ca<sup>2+</sup>, enquanto que o L-NAME sozinho não influenciou a taxa de ocorrência das *sparks* de Ca<sup>2+</sup>.



**Figura 22: ON é importante mediador dos efeitos da Ang(1-7) sobre a sinalização de Ca<sup>2+</sup> em cardiomiócitos tratados com aldosterona.** **A.** Tratamento de miócitos com L-NAME sozinho não tem efeito na amplitude do transiente Ca<sup>2+</sup>. **B.** O tratamento com L-NAME reduz significativamente a magnitude do transiente de Ca<sup>2+</sup> em cardiomiócitos tratados com aldosterona e Ang(1-7). **C.** O tratamento com L-NAME restaura os efeitos da aldosterona na taxa de sparks de Ca<sup>2+</sup> em miócitos ventriculares incubados com aldosterona e Ang(1-7). n=número de cardiomiócitos. \*p<0.05 quando comparados com outros grupos. #p<0.05 quando comparado ao controle. †p<0.05 quando comparado a cardiomiócitos tratados com aldosterona e Ang(1-7).

Alterações na expressão gênica são observadas durante o tratamento agudo com aldosterona, podendo contribuir para os efeitos cardíacos desse hormônio, em longo prazo. Primeiramente avaliamos os genes que são expressos durante o desenvolvimento embrionário, como por exemplo, genes que codificam o peptídeo natriurético atrial (ANP) e cadeia pesada da miosina do tipo β (β-MHC) (Frey e Olson, 2003) e somente são reexpressos sob condições de estresse ou em resposta a

hipertrofia cardíaca. As células de ratos foram então tratadas com aldosterona na presença de Ang-(1-7) e a expressão destes marcadores foi avaliada. Os níveis de expressão do RNA mensageiro (RNAm) que codifica para ANP e  $\beta$ -MHC estão representados na figura 23 A-B. Os marcadores de estresse avaliados foram re-expressos somente em cardiomiócitos tratados com aldosterona quando comparados ao grupo controle e aldosterona/Ang-(1-7). Esses resultados demonstram que a Ang-(1-7) previne a reativação desses genes. Decidimos então avaliar se somente a incubação de Ang-(1-7) em cardiomiócitos seria capaz de modular os genes que codificam ANP e  $\beta$ -MHC. Podemos observar na figura 23C-D que a Ang-(1-7) por si só é capaz de promover uma redução na expressão dos transcritos desses genes. Esse é um forte indicativo do papel protetor da Ang-(1-7) contra os efeitos da aldosterona.

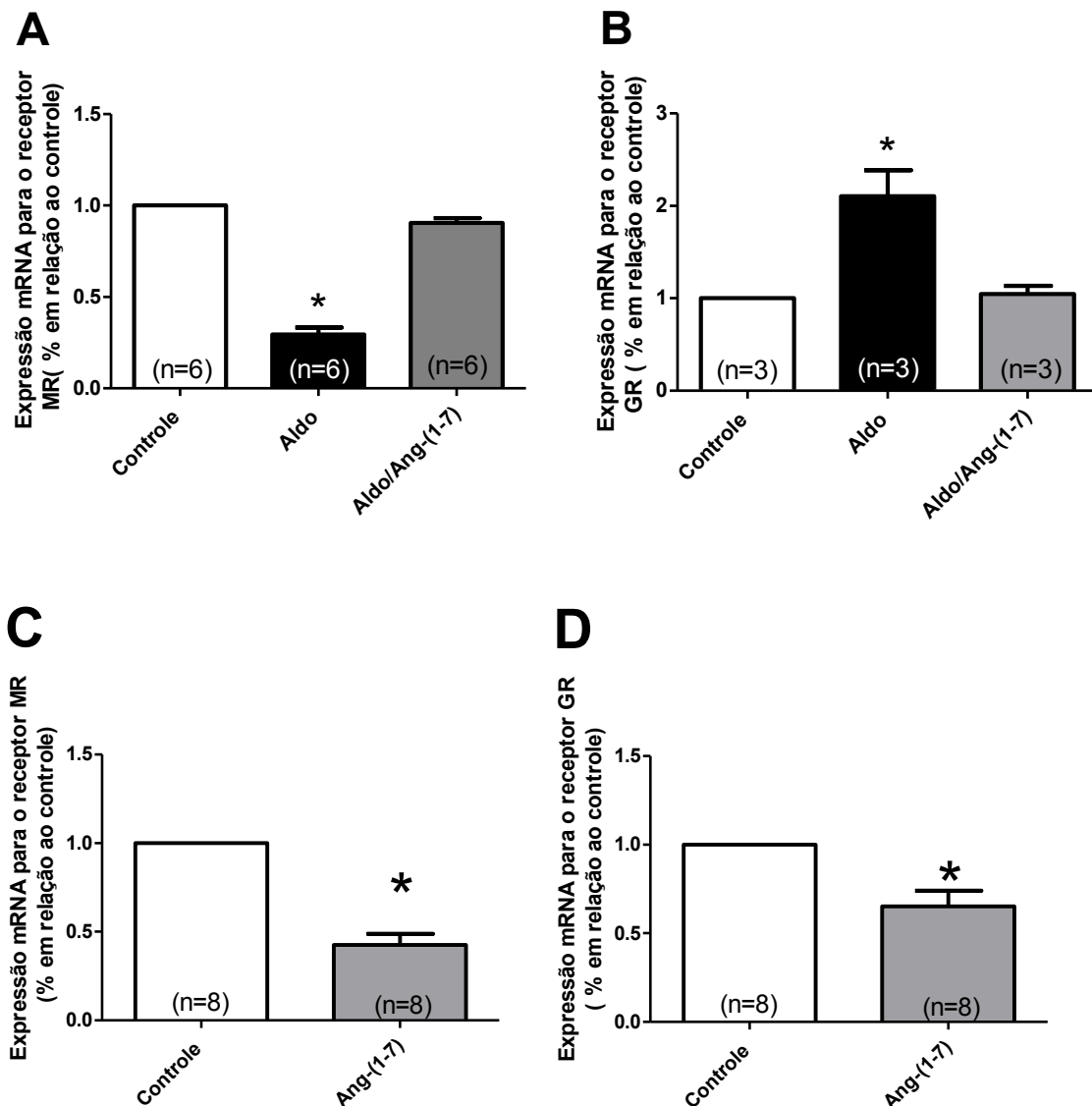


**Figure 23: Aldosterona e Ang-(1-7) modulam os níveis de transcrição gênica ANP e  $\beta$ -MHC.** **A.** Experimentos de PCR tempo real, revelam um aumento significativa dos níveis de mRNA que codificam para o ANP após o tratamento com aldosterona, (1 $\mu$ mol/L) por 30 minutos o qual foi prevenido pela Ang-(1-7). **B.** O aumento na transcrição de mRNA que codifica

para o  $\beta$ -MHC foi observado em miócitos tratados com aldosterona. Ang-(1-7) também antagonizou o efeito da aldosterona sobre os níveis de transcrição de  $\beta$ -MHC. Os resultados são de três experimentos independentes. **C-D** O tratamento somente com Ang-(1-7) foi capaz de promover uma redução dos genes que codificam tanto ANP quanto  $\beta$ -MHC. \*  $p < 0,05$  quando comparado com os outros grupos.

Um passo fundamental para a sinalização intracelular mediada pela aldosterona é a ativação do MR e GR, sendo assim, avaliamos as consequências desencadeadas pelo tratamento com aldosterona e Ang-(1-7) e como essas duas vias de sinalização modulam a transcrição de mRNA que codifica os genes para receptores GR e MR em cardiomiócitos ventriculares. Como mostrado na Figura 24 A-B, a aldosterona promoveu um *downregulation* do RNA mensageiro (mRNA) que codifica para o MR e de maneira inversa causa um *up-regulation* na transcrição de mRNA que codifica para o GR. Nossos resultados mostraram que a Ang-(1-7) antagoniza os efeitos da aldosterona sobre a expressão de genes que codificam o mRNA para ambos os receptores MR e GR. Na figura 24 C-D foi demonstrado que tratamento somente com a Ang-(1-7) é capaz de modular significativamente os genes que codificam MR e GR. Esses resultados indicam que a Ang-(1-7), além de modular a dinâmica do  $Ca^{2+}$ , também é capaz de modular um outro aspecto importante da sinalização da aldosterona que inclui alterações na expressão gênica.





**Figure 24: Aldosterona e Ang-(1-7) modulam os níveis de transcrição gênica de MR e GR.**

**A.** Experimentos de PCR tempo real, revelam uma diminuição significativa dos níveis de mRNA que codificam para o MR após o tratamento com aldosterona, ( $1\mu\text{mol/L}$ ) por 30 minutos o qual foi prevenido pela Ang-(1-7). **B.** O aumento na transcrição de mRNA que codifica para o GR foi observado em miócitos tratados com aldosterona. Ang-(1-7) antagonizou o efeito da aldosterona sobre os níveis de transcrição de GR. Os resultados são de três experimentos independentes. **C-D** O tratamento somente com Ang-(1-7) foi capaz de promover uma redução dos genes que codificam tanto MR quanto GR. \*  $p < 0,05$  quando comparado com os outros grupos.

A tabela 2 sumariza as principais alterações celulares encontradas em miócitos ventriculares tratados com aldo/Ang-(1-7).

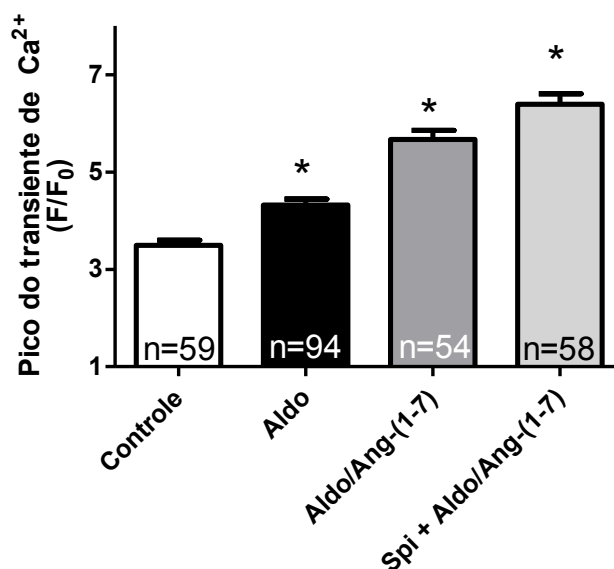
**Tabela 2: Resumo de todas as alterações celulares observadas em miócitos ventriculares tratados com aldosterona e Ang-(1-7).**

	Ang-(1-7)	Aldosterona	Aldo+Ang-(1-7)
Amplitude do transiente de Ca <sup>2+</sup>	-	↑	↑↑
Conteúdo de Ca <sup>2+</sup> SR	*	-	↑
Fosforilação da PLN-Ser <sup>16</sup>	*	↑	↑
Fosforilação da Tni	-	↑	↑↑
Taxa de <i>spark</i> Ca <sup>2+</sup>	-	↑	↓
Óxido Nítrico	↑	-	↑
Produção de EROS	-	↑	↓
Nitrotirosina	↑	-	↑↑
mRNA para β-MHC	↓	↑	↓
mRNA para ANP	↓	↑	↓
mRNA para MR	↓	↓	↑
mRNA para GR	↓	↑	↓

↑ = aumento, ↓ = redução, - = sem alteração, \* = não foi medido. Grupo aldo/Ang-(1-7) foi comparado com o grupo tratado com aldosterona.

Uma pergunta fundamental levantada a partir deste trabalho é se concentrações de aldosterona que ativam apenas receptores MR associadas a Ang-(1-7) também exerceriam efeito sinérgico na amplitude do transiente de Ca<sup>2+</sup>. Nosso próximo passo foi avaliar o pico transiente de Ca<sup>2+</sup> em concentrações de aldosterona (10 nmol/L), nessa condição apenas receptores de MR seriam ativados. A figura 25 mostrou que assim como o tratamento em concentrações suprafisiológicas de

aldosterona a Ang-(1-7) foi capaz de promover efeito sinérgico similar em concentrações fisiológicas.



**Figura 25: Concentrações fisiológicas de aldosterona (10nmM) resultam em efeito sinérgico com a Ang-(1-7) na magnitude do transiente de cálcio. A.** Gráfico de barras mostrando o efeito sinérgico entre as vias de sinalização da aldosterona e Ang-(1-7) na amplitude do transiente Ca<sup>2+</sup> em cardiomiócitos tratados com concentração fisiológica de aldosterona (10 nmol/L) e antagonista de MR (Spironolactona). \* p<0,05 quando comparado com os outros grupos experimentais. n = número de células.

Esse resultado é de vital importância para o prosseguimento do trabalho pois nos mostra que tais efeitos sinérgicos encontrados entre aldosterona e Ang-(1-7) podem ser atribuídos plenamente a ativação de receptores de mineralocorticóide. Outro ponto interessante que podemos observar nesses resultados é que o tratamento com spironolactona não foi capaz de inibir o aumento no pico do transiente de Ca<sup>2+</sup> observados nas células tratadas com aldo na presença de Ang-(1-7). Pelo contrário, ele potencializou ainda mais o efeito no pico do transiente de Ca<sup>2+</sup>. Esse resultado sugere a participação de outro receptor ativado pela aldosterona que não é inibido pela spironolactona.

## 6. DISCUSSÃO

Este trabalho aborda as vias de sinalização da aldosterona e Ang-(1-7) no cardiomiócito e as consequências desta sinalização. Em conjunto, nossos resultados trazem novas perspectivas para a compreensão de como as duas moléculas de grande relevância e com ações cardíacas supostamente antagônicas se associam para amplificar funcionalmente a sinalização de  $Ca^{2+}$  na célula cardíaca. Em 2007 Guder e colaboradores, mostraram que elevados níveis séricos de aldosterona foram identificados como um preditor importante de risco de mortalidade em pacientes com insuficiência cardíaca crônica, de qualquer causa e severidade. Em contrapartida, a Ang-(1-7) já demonstrou repetidamente em alguns trabalhos possuir efeitos cardioprotetores, atenuando e até mesmo prevenindo o remodelamento cardíaco patológico *in vitro* (Gomes cols., 2010; Tallant e cols., 2005) e *in vivo* (Gomes e cols., 2010; Grobe e cols., 2007; Loot., 2002; Mercure e cols., 2008; Santos e cols., 2004) em resposta a vários fatores, inclusive induzida por ativação excessiva de MR. (Gomez e cols., 2009; Grobe e cols., 2006). Um aspecto notável é que tratamento agudo com Ang-(1-7) aumenta ainda mais os efeitos da aldosterona na sinalização de  $Ca^{2+}$ , apontando um efeito sinérgico entre essas moléculas. Esta observação foi inicialmente inesperada porque estudos anteriores mostraram efeitos antagônicos exercidos por estas duas moléculas no coração. (Grobe e cols., 2006; Santiago e cols., 2010). Por meio deste trabalho demonstramos que a Ang-(1-7) age conjuntamente com a aldosterona de maneira funcional através de vias de transdução paralelas e convergentes que incluem a ativação da PKA e produção de ON, culminando com maior liberação de  $Ca^{2+}$  nos miócitos ventriculares. Estes achados têm implicações importantes, inclusive na clínica, uma vez que possibilita uma maior compreensão de como duas vias de sinalização importantes interagem no coração, mais especificamente na célula cardíaca. Uma possibilidade levantada neste trabalho é que este efeito sinérgico na sinalização de cálcio, possa resultar em amplificação da cardioproteção induzida pela Ang-(1-7), impedindo a deterioração progressiva na contratilidade do miocárdio associado ao aumento dos níveis de aldosterona.

Ao utilizarmos uma dose suprafisiológica de aldosterona ( $1\mu\text{mol/L}$ ), foi observado um aumento no pico do transiente de  $Ca^{2+}$ . Esse resultado corrobora com os achados descritos por Benitah e colaboradores., (1999) e Perrier e colaboradores., (2005). Os miócitos cardíacos quando tratados com antagonistas de MR (spironolactona) e GR (mifepristona) separadamente, apresentaram um aumento menos pronunciado do pico do transiente de  $Ca^{2+}$ . Por outro lado, ao incubar concomitantemente os dois antagonistas (spironolactona, MR) e (mifepristona, GR),

foi observada uma completa inibição do aumento do pico do transiente de  $Ca^{2+}$ . Esse resultado comprova a importância de ação conjunta dos receptores MR e GR no aumento do pico do transiente de  $Ca^{2+}$  em condições de estimulação suprafisiológicas de aldosterona.

Após comprovada a participação da aldosterona no aumento do transiente de cálcio, o próximo ponto verificado foi se a Ang (1-7) na dose de (100nmol/L) poderia influenciar a resposta da aldosterona no transiente de  $Ca^{2+}$ , sabendo que esta é conhecida por apresentar efeitos benéficos no cardiomiócito (Gomes e cols., 2010 ; Almeida e cols., 2015). De maneira inesperada, o tratamento concomitante de aldosterona e Ang-(1-7) promoveu um maior aumento na magnitude do transiente de  $Ca^{2+}$ , 25% acima dos níveis observados em células expostas ao tratamento apenas com aldosterona. Esse resultado foi ainda mais surpreendente, uma vez que Dias-Peixoto e colaboradores (2008), demonstraram que tratamento de cardiomiócitos somente com Ang-(1-7) na mesma dose utilizada pelo nosso grupo, não altera a amplitude do transiente de  $Ca^{2+}$ . Portanto, no presente trabalho foi mostrado que a associação entre Ang-(1-7) e aldosterona influencia diretamente na amplitude do transiente de  $Ca^{2+}$  tanto em cardiomiócitos de ratos quanto em camundongos (Almeida e cols., 2013).

Em 2003 Santos e colaboradores identificou o principal ligante endógeno da Ang-(1-7), o receptor Mas. Estudos já mostraram a participação desse receptor Mas mediado pela ação da Ang-(1-7) em importantes mecanismos envolvidos na proteção do sistema cardiovascular (Santos e cols., 2006; Dias-Peixoto e col., 2008). Em 1998 Walther e colaboradores desenvolveram um animal geneticamente modificado que apresenta ausência do receptor Mas (animais Mas-KO). Utilizando esse modelo experimental comprovamos que o sinergismo observado entre aldosterona e Ang-(1-7) é dependente do receptor Mas, uma vez que cardiomiócitos de animais Mas-KO quando tratados com aldosterona e Ang-(1-7) simultaneamente não apresentam a resposta sinérgica observada nos animais wild type. Por outro lado a resposta da aldosterona no transiente de  $Ca^{2+}$  manteve-se preservada nos cardiomiócitos de camundongos Mas-KO.

Portanto como será que a Ang-(1-7) é capaz de aumentar o transiente de  $Ca^{2+}$  em cardiomiócitos tratados com Aldosterona?

Existem pontos-chaves na maquinaria de  $Ca^{2+}$  nos cardiomiócitos. A corrente de  $Ca^{2+}$  tipo L, que determina o influxo de  $Ca^{2+}$  para o interior celular e o conteúdo de  $Ca^{2+}$  do RS. Ambos os processos determinantes para se elevar o transiente de  $Ca^{2+}$ .

Primeiramente avaliou-se a corrente de  $\text{Ca}^{2+}$  tipo L. É sabido que um importante ativador do canal de  $\text{Ca}^{2+}$  tipo L é a PKA. Esta por sua vez é capaz de fosforilar o canal e quando fosforilado este canal permite um aumento no influxo de íons levando ao aumento da corrente de  $\text{Ca}^{2+}$ .

Nossos resultados mostraram que tratamento agudo com aldosterona induz ativação moderada de PKA em cardiomiócitos ventriculares, o que leva a um aumento no transiente de  $\text{Ca}^{2+}$ , possivelmente através do aumento da corrente de  $\text{Ca}^{2+}$  do tipo L (ICa). Esses achados estão de acordo com (Benitah e cols., 1999; Perrier e cols., 2005). Importante observar que a Ang-(1-7) não foi capaz de interferir na amplitude da corrente de cálcio, ou seja alterações na corrente de cálcio não explicam o efeito sinérgico da aldosterona e da Ang-(1-7) no transiente de cálcio. Esse dado é de fundamental importância visto que podemos chegar a duas conclusões: A primeira que a ativação da PKA é fundamental para o aumento do transiente de  $\text{Ca}^{2+}$  nessas condições e a segunda é que existe outro fator responsável pelo aumento ainda maior no transiente de  $\text{Ca}^{2+}$  nas células tratadas com aldosterona e Ang-(1-7).

Já foi demonstrado na literatura que a PKA tem vários alvos celulares na célula cardíaca, dentre eles podemos citar o canal de  $\text{Ca}^{2+}$  tipo L, o receptor de RyR, e a fosfolambam (Bers, 2001 e 2002a).

Dentre esses alvos destaca-se a fosfolambam. É sabido que a fosfolambam é um poderoso regulador da SERCA. O estado não fosforilado dessa proteína faz com que a mesma iniba a bomba de  $\text{Ca}^{2+}$  do RS (SERCA), vale ressaltar que no estado fisiológico essa proteína (PLN) continua ativa, porém com menor atividade. Sendo assim, quando a fosfolambam é fosforilada por exemplo pela PKA o que acontece é que ela solta do complexo SERCA/PLN e nessas condições a atividade da SERCA é aumentada. Nossos resultados mostraram que os níveis de fosforilação da fosfolambam no sítio da PKA (ser16) encontram-se similares em cardiomiócitos tratados com aldosterona e aldosterona na presença da Ang-(1-7), contudo aumentados em relação as células do grupo CT.

Baseado no fato que a Ang-(1-7) não influencia o transiente de  $\text{Ca}^{2+}$  analisamos o outro fator determinante para elevação do transiente de  $\text{Ca}^{2+}$  no cardiomiócito, o conteúdo de  $\text{Ca}^{2+}$  do RS. Em relação ao grupo tratado com aldosterona, a Ang-(1-7) não é responsável por aumentar o conteúdo de  $\text{Ca}^{2+}$  do RS.

O conteúdo de  $\text{Ca}^{+2}$  do SR em cardiomiócitos ventriculares é determinado pela atividade da SERCA, responsável pela recaptção de  $\text{Ca}^{+2}$  e também pelo efluxo de  $\text{Ca}^{+2}$  via receptor de RyR. Como mostrado anteriormente os nossos resultados descartaram a participação da PLN e da SERCA na tentativa de explicar o aumento do transiente de  $\text{Ca}^{2+}$  em miócitos ventriculares tratados com aldosterona e aldosterona na presença da Ang-(1-7). Esse fato estava relacionado ao período de incubação da aldosterona na célula. (30 minutos), considerado curto para que haja a síntese de SERCA. Além disso, os níveis da fosforilação fosfolambam não estavam alterados em células tratadas com aldosterona e aldosterona na presença de Ang-(1-7) como visto anteriormente. Sabendo que o conteúdo de  $\text{Ca}^{2+}$  do RS é também determinado pelo efluxo de  $\text{Ca}^{2+}$  via RyR. Nossos resultados mostraram que o tratamento com aldosterona aumenta a atividade do receptor de RyR, permitindo um maior vazamento de  $\text{Ca}^{2+}$  do RS para o citosol. Esse resultado é determinado pelo frequência aumentada de sparks de  $\text{Ca}^{2+}$  nessas células. Vale ressaltar que a spark de  $\text{Ca}^{2+}$  é a liberação espontânea de  $\text{Ca}^{2+}$  durante a diástole. Desta forma, a redução na frequência das *sparks* de cálcio no grupo aldosterona/Ang-(1-7), quando comparado ao grupo aldosterona leva a um aumento do conteúdo de cálcio nas células tratadas com ambos aldosterona e Ang-(1-7), culminando em um maior transiente de cálcio.

Consistente com os nossos resultados, outros estudos demonstraram que aumentos nos níveis da aldosterona promovem incrementos nos níveis de cAMP em células do músculo liso vascular (Christ e cols., 1999) e dutos coletores medulares internos (Sheader e cols., 2002). Além disso, o conteúdo de  $\text{Ca}^{2+}$  do RS não é alterado em cardiomiócitos tratados com aldosterona apesar do aumento da fosforilação da PLN Ser<sup>16</sup>. Portanto, concluímos que o efeito completo de ativação da PKA na carga de  $\text{Ca}^{2+}$  do RS em células tratadas com aldosterona foi mascarado pelo aumento da taxa de sparks de  $\text{Ca}^{2+}$ .

Curiosamente, a PKA permanece ativada em células tratadas com uma combinação de aldosterona e Ang-(1-7), como pode ser visto pela redução significativa na amplitude do transiente de  $\text{Ca}^{2+}$  observada neste grupo, quando tratado com PKI, um inibidor de PKA. Desta forma, em condições onde a PKA está ativada, a Ang-(1-7) é responsável por aumentar a produção de ON em miócitos tratados com aldosterona, tendo o ON um papel crucial nos efeitos da sinérgicos da Ang-(1-7) sobre o transiente de  $\text{Ca}^{2+}$ . O ON pode interagir com proteínas envolvidas no AEC e é conhecido por regular o canal de  $\text{Ca}^{2+}$  do tipo L (Campbell e cols., 1996) e o receptor de RyR (Zahradníková e cols., 1997), funcionando tanto como um agente inotrópico

positivo ou negativo. Pelo fato da Ang-(1-7) ser a responsável pelo aumento dos níveis de ON, sem alterar o transiente de  $Ca^{2+}$ , é concebível que o impacto no transiente de  $Ca^{2+}$  em condições de associação entre Ang-(1-7)/aldosterona dependa de outros fatores, tais como o grau de ativação PKA. De acordo com a literatura, funcionalmente, a interação entre a sinalização da PKA e ON pode acarretar tanto no aumento, quanto atenuar a liberação de  $Ca^{2+}$  em miócitos ventriculares. (Ziolo e cols., 2001). Neste contexto, Ziolo e cols., 2001 demonstraram que o efeito do ON sobre a atividade do receptor de RyR e conseqüentemente no transiente de  $Ca^{2+}$  podem ser moduladas pelo estado de ativação da PKA. A ativação de PKA leva à fosforilação de várias proteínas envolvidas no AEC incluindo o RyR. Neste contexto, a fosforilação do receptor de RyR pela PKA acarreta em um aumento da probabilidade de abertura desse canal ( $P_o$ ), que é visto através do aumento na taxa de *sparks* de  $Ca^{2+}$  no repouso, de encontro aos nossos resultados, este aumento das *sparks* de cálcio foi revertido pelo tratamento com o doador de ON (Ziolo e cols., 2001). No presente estudo, as células tratadas com aldosterona levaram ao aumento das *sparks* de cálcio, sendo que na presença da Ang-(1-7) este efeito da aldosterona foi inibido. Considerando que a Ang-(1-7) induz a produção de ON, podemos especular que o ON dependente da Ang-(1-7) é capaz de atenuar o aumento das *sparks* de cálcio. Maior suporte a esta idéia veio do fato de que o tratamento com o L-NAME, aboliu o efeito da Ang-(1-7) na frequência das *sparks*. Tomados em conjunto, estes resultados sugerem que a probabilidade de abertura do receptor de RyR é significativamente reduzida em miócitos tratados com aldosterona quando expostas ao tratamento com Ang-(1-7). Assim, nossos resultados revelam um papel, previamente não identificado para Ang-(1-7), como um modulador das *sparks* de  $Ca^{2+}$  no coração, sob condições de elevados níveis de aldosterona. De fato, foi demonstrado por Gomez e cols., 2009 que a aldosterona afeta diretamente a atividade do receptor de RyR, levando a dissociação da FKBP12.6, um importante estabilizador do receptor de rianodina. Como consequência, foi observado um aumento no número de *sparks* de  $Ca^{2+}$  anormais em miócitos ventriculares. Essa liberação de  $Ca^{2+}$  anômala durante a diástole tem sido associada ao desenvolvimento de arritmias cardíacas em modelo de insuficiência cardíaca (Wehrens e cols., 2005). Uma implicação potencialmente importante das nossas descobertas é que Ang-(1-7), através da redução da taxa de *sparks* de  $Ca^{2+}$  na presença de aldosterona, pode proteger o coração contra arritmias fatais.

No repouso, quando a concentração de cálcio intracelular é baixa ( $\sim 10^{-7}$  M), o sítio da TnC sensível ao cálcio está desocupado. Nesta condição a interação entre TnI



e TnC é fraca, favorecendo a interação de TnI com actina. Isto favorece a configuração do complexo troponina-tropomiosina de tal forma a esconder o sítio ativo da actina, que interage com a miosina. Quando a  $[Ca^{2+}]_i$  aumenta ( $10^{-6}$ ~ $10^{-5}$  M), o  $Ca^{2+}$  se liga ao seu sítio na TnC. Esse fenômeno favorece a interação da TnC com TnI, a qual desestabiliza a interação da TnI com a actina. A interação TnC-TnI desloca a TnI do sítio ativo da actina, retirando o impedimento estérico, que ocorre em baixas concentrações de cálcio. Dessa forma, a miosina pode-se ligar a actina, ativando a atividade ATPásica da miosina, sendo dessa forma deflagrada a contração, através do fenômeno da cooperatividade (Bers, 2008). Decidimos medir a expressão da fosfo-troponina I para avaliar uma das proteínas responsáveis pela contração celular. Nossos resultados sugerem que a aldosterona é capaz de diminuir a sensibilidade dos miofilamentos ao  $Ca^{2+}$ , promovendo uma contração celular mais rápida (Wenzel e cols., 2010), uma vez que a aldosterona leva a aumento da fosforilação da TnI. A presença da Ang-(1-7) em cardiomiócitos tratados com aldosterona é responsável por gerar uma fosforilação ainda maior da P-TnI.

O AEC no cardiomiócito é modulado pela presença do ON. Esta produção está associada principalmente a duas isoformas das óxido nítrico sintases. A NOS3 é expressa nas caveólas da membrana sarcoplasmática e dos túbulos-T, onde ela interage com a caveolina-3 (Feron e cols., 1996; Garcia-cardena e cols., 1996; Barouch e cols., 2002; Feron e cols., 1998), o canal de cálcio tipo-L e o receptor  $\beta_3$ -adrenérgico (Bredt, 2003), enquanto a NOS1 é expressa no retículo sarcoplasmático (RS), onde ela interage com o RyR (Barouch e cols., 2002), e na mitocôndria (Kanai e cols., 2001). Assim, os efeitos intracelulares do ON são diferentes conforme o compartimento intracelular específico onde a NOS se localiza (Belge e cols., 2005).

Níveis de fosforilação da NOS3 na Ser<sup>1177</sup> aumentaram significativamente em miócitos tratados conjuntamente com aldosterona/Ang-(1-7). Corroborando estes achados, Dias Peixoto e cols., 2008 demonstraram anteriormente que tratamento apenas com Ang-(1-7) aumenta a fosforilação de NOS3 em cardiomiócitos. Regulação da síntese de NO por NOS3 representa uma via final crítica comum para explicar o benefício de vários tratamentos eficazes tanto para isquemia aguda do miocárdio, quanto para insuficiência cardíaca congestiva. (Hafezi-Moghadam e cols., 2002). Assim, é possível que a ativação da NOS3 constitua uma característica celular marcante das ações benéficas da Ang- (1-7).

Além disso, foi demonstrado por nós que a NOS1 é modulada pela Ang-(1-7) em células tratadas aldosterona. Dando suporte a esta constatação, ratos

transgênicos com aumento crônico nos níveis circulantes de Ang-(1-7) apresentaram elevação nos níveis de expressão de NOS1 em miócitos ventriculares (Gomes e cols., 2010), sugerindo a NOS1 como importante alvo da Ang-(1-7) em cardiomiócitos ventriculares. Além do mais, tem sido mostrado que a NOS1 participa da modulação na sinalização de  $Ca^{2+}$  nos miócitos ventriculares (Barouch e cols., 2002). Conforme esse trabalho, a inibição aguda da NOS1 reduziu significativamente a amplitude do transiente de  $Ca^{2+}$ . (Wang e cols., 2008). Nossos dados sugerem que o NO derivado da NOS1 também desempenha um papel importante nos efeitos protetores da Ang-(1-7) em cardiomiócitos, no entanto a contribuição específica de cada isoforma das NOS, ainda precisa ser determinada.

Já foi demonstrado que a NOS1 tem uma localização preferencial no RS, onde esta colocaliza-se com a enzima xantina oxidoreductase. (Khan e cols., 2004). Este sistema espacialmente confinado regula o potencial redox da célula, uma vez que a NOS1 regula negativamente a atividade da xantina oxidoreductase (XOR). (Khan e cols., 2004). Neste contexto, tem sido demonstrado que a deficiência de NOS1 estimula a produção de  $O_2^-$  mediada pela XOR, levando à diminuição da contratilidade. É importante pontuar que ainda não é conhecida a contribuição da XOR para os efeitos da aldosterona em células cardíacas. No entanto, um mecanismo possível para a Ang-(1-7), é que esta exerça as suas ações anti-oxidantes modulando a atividade da XOR através da NOS1. Além da XOR, existem várias fontes de produção de EROS em cardiomiócitos. Foi demonstrado por Rude e cols., 2005 que a aldosterona aumenta  $O_2^-$  (anion superóxido) através da ativação da NADPH oxidase e que este processo desempenha um papel importante no desenvolvimento das patologias cardíacas induzidas pela aldosterona. (Sun e cols., 2002). Além disso, sabe-se que um alvo importante do stress oxidativo é o RyR. Visto que o RyR é alvo de sinalização redox é concebível que a ação antioxidante da Ang-(1-7) possa regular a atividade RyR, alterando a probabilidade de abertura do canal e/ou por prevenir a dissociação de FKBP12.6. Esta hipótese é baseada nos nossos dados de conteúdo de  $Ca^{2+}$  do RS e das sparks de cálcio, como citado anteriormente. Como a Ang-(1-7) aumenta a carga de  $Ca^{2+}$  do RS em miócitos tratados com aldosterona. Uma vez que o conteúdo de  $Ca^{2+}$  do RS reflete o equilíbrio entre a recaptação de  $Ca^{2+}$  através do RS via  $Ca^{2+}$  ATPase, e efluxo de  $Ca^{2+}$  através do RyR, uma redução no vazamento de  $Ca^{2+}$  é consistente com o aumento do conteúdo de  $Ca^{2+}$  do RS encontrado em miócitos tratados com aldosterona, quando expostos a Ang-(1-7). No entanto, mais experimentos são necessários para investigar plenamente se a sinalização da Ang-(1-7) modula diretamente a atividade RyR.

Alteração no equilíbrio fisiológico entre ON e EROS está envolvida de maneira crítica no desenvolvimento de doenças cardiovasculares. Recentemente foi demonstrado que a aldosterona aumenta os níveis de EROS em miócitos ventriculares, através da ativação da NADPH oxidase (Rossier e cols., 2008). Foi observado nos nossos resultados que o tratamento com aldosterona leva a um aumento significativo de EROS mitocondrial, corroborando os achados de Rossier e cols., (2008), e que o tratamento com Ang-(1-7) preveniu parcialmente esse efeito, sugerindo uma importante ação antioxidante de Ang-(1-7) em células cardíacas.

Por outro lado, o superóxido( $O_2^-$ ) produzido localmente pode contra regular ações do óxido nítrico. No RS a oxidação do receptor de rianodina reduz sua atividade, e ao nível do sarcolema o  $O_2^-$  pode provocar desacoplamento da NOS3. A NOS3 desacoplada é mais uma fonte de superóxido. Ainda há a combinação do ON ao  $O_2^-$  gerando peroxinitrito ( $ONOO^-$ ) que possui efeitos tóxicos na célula pela sua ação oxidante. Sabe-se que o peroxinitrito ( $ONOO^-$ ) é produto da reação de óxido nítrico e de anion superóxido, sendo este um efetor importante em várias patologias, com alta ação oxidante de proteínas. Essa espécie reativa de oxigenio , exerce efeitos bifásicos sobre a função de cardiomiócitos, de tal modo que baixas concentrações aumentam a (Kohr e cols., 2008a; Paolocci e cols., 2000) e altas concentrações diminuem (Kohr e cols., 2008a; Stojanovic e cols., 2001 e Kohr e cols., 2008b) a contração. Inesperadamente, nosso estudo revelou que a Ang-(1-7) é capaz de aumentar os níveis de peroxinitrito em células tratadas com aldosterona, além do mais Ang-(1-7), sozinha, também foi capaz de aumentar os níveis celulares de peroxinitrito. As consequências deste aumento dos níveis de peróxido de nítrito para a célula cardíaca, ainda são desconhecidos. No entanto, dados recentes da literatura apontam para uma ação regulatória do peróxido de nítrito na célula cardíaca. Ziolo e cols., 2008 demonstraram que a atividade da PKA pode ser aumentada pelo peroxinitrito, e que este efeito está relacionado a óxido nítrico sintase neuronal (NOS1). Portanto, NOS1 pode regular a contração dos cardiomiócitos, por produção de peroxinitrito, via ativação da PKA. Demonstrou-se que a regulação da contração dos cardiomiócitos através da NOS1 passa pela modulação na fosforilação da  $PLB^{Ser16}$  através da produção de peroxinitrito (Whang E cols., 2008). Baseado nesta literatura, podemos especular que a Ang-(1-7) sustente a ativação da PKA induzida pelo tratamento com aldosterona através da produção de peroxinitrito via NOS1. No entanto, em células tratadas apenas com Ang-(1-7), é observado o aumento do peroxinitrito, embora não tenha sido detectada aumento de fosforilação da PLN no sítio Ser16 (sítio fosforilado pela PKA). Ausência de fosforilação da PLN no sítio Ser16, indica ausência de

ativação da PKA. Esta observação vai contra os resultados propostos na literatura sendo assim serão necessários mais experimentos afim de elucidar a relação entre os níveis de peroxinitrito, ativação da PKA e a Ang-(1-7) em cardiomiócitos.

Outro conceito novo e importante na fisiologia do ON é o balanço entre espécies reativas de oxigênio (EROS), dentre as quais o superóxido ( $O_2^-$ ) e as espécies reativas de nitrogênio (ERN), como o ON. Este balanço recebeu a denominação de balanço nitroso oxidativo (Hare & Stamler, 2005). O ON regula diversas características da fisiologia cardíaca, entre elas a energética cardíaca, o AEC, o inotropismo e o lusitropismo (Hare, 2003; Belge e cols., 2005; Massion e cols., 2003; Danson e cols., 2005; Hare, 2004a); e em muitos destes casos tanto as EROS quanto as ERN participam (Hare & Stamler, 2005). Em uma visão inicial, as EROS inativavam a atividade biológica das ERN, gerando outras espécies tóxicas e reativas, como o peroxinitrito já citado anteriormente (Gryglewski e cols., 1986). A S-nitrosilação oferece um modo alternativo para as EROS e as ERN interagirem. EROS em excesso podem impedir a S-nitrosilação protéica fisiológica, já que as EROS podem tanto reagirem com os mesmos radicais tióis que são alvos da S-nitrosilação quanto mudarem a propensão da proteína de sofrer S-nitrosilação (Xu e cols., 1998). A descrição acima da regulação do RyR pelas ERN e EROS se encaixa dentro deste conceito.

Assim, o desequilíbrio nitroso-oxidativo pode prejudicar a S-nitrosilação protéica e desregular a energética cardíaca e o AEC (Hare, 2004b; Hare & Stamler, 2005). Este desequilíbrio pode resultar tanto de formação excessiva de EROS quanto de redução da formação de ERN. Porém, nossos resultados mostram que a Ang-(1-7) é capaz de modular tanto produção de EROS, quanto a produção de ON através das NOS1 e NOS3.

As ações rápidas, não-genômicas da aldosterona, particularmente em tecidos não-epiteliais tais como: células da musculatura lisa vascular, linfócitos, células endoteliais, miócitos cardíacos e células renais vem sendo especuladas. Nesses tecidos foram observados os efeitos precoces causados pela aldosterona (< 15 minutos), que não são sensíveis aos inibidores spironolactona e eplerenona. (Booth e cols., 2002, Connell e cols., 2005). Acredita-se que as ações não-genômicas da aldosterona sejam mediadas por meio de outro tipo de receptor (talvez um receptor de membrana) que seja diferente do MR clássico (Sakaie e cols., 2000) indetificado na musculatura lisa vascular por Gross e cols., 2011, o GPR30. Foi demonstrado por nós que respostas rápidas induzidas pela aldosterona no cardiomiócito também ocorrem

de maneira similar a musculatura lisa vascular (Gross e cols., 2011). Foi observado que o tratamento agudo com aldosterona aumenta o transiente de  $Ca^{2+}$  e que o tratamento com spironolactona, o antagonista clássico de receptores de MR, não foi capaz de antagonizar tais efeitos. Este resultado sugere que em condições onde o receptor de MR está inibido, o efeito sinérgico da aldosterona e Ang-(1-7) no transiente de cálcio está exacerbado. Interessante que este mesmo efeito não é observado nas células tratadas apenas com aldosterona na presença da spironolactona, sugerindo que a presença da Ang-(1-7) é fundamental para este efeito sinérgico exacerbado, em condições de inibição do MR..

Um ponto crítico de sinalização aldosterona é o contexto no qual ocorre a ativação de MR e GR. Nossos resultados indicaram que aldosterona promoveu um *downregulation* do RNA mensageiro (mRNA) que codifica para o MR e de maneira inversa causa um *up-regulation* na transcrição de mRNA que codifica para o GR. Nossos resultados mostraram que a Ang-(1-7) antagoniza os efeitos da aldosterona sobre a expressão de genes que codificam o mRNA para ambos os receptores MR e GR. Sabe-se que o estado redox da célula influencia diretamente a contribuição relativa a resposta desencadeada por cada receptor. A identificação de uma convergência na sinalização entre aldosterona e Ang-(1-7), sob condições em que ambos os receptores estão ativados levou-nos a especular se Ang- (1-7) poderia ser capaz de modular as ações mediadas pelo balanço entre os receptores de MR e GR. Um ponto a ser observado é que a Ang-(1-7) foi capaz de modular significativamente os genes que codificam MR e GR. Esses resultados indicam que a ação antioxidante da Ang-(1-7) associada com a sua capacidade para manter a ativação da PKA induzida pela aldosterona, confere a este peptídeo a capacidade de manter a função contrátil e preservar o estado redox da célula em condições de excesso de aldosterona.

## 7. CONCLUSÃO

Nossas descobertas de um *cross-talk* entre as vias de sinalização da Ang-(1-7) e aldosterona sob condições em que ambos os receptores são ativados em cardiomiócitos desvendou uma sinalização até então desconhecida que inclui vias que possuem ações sinérgicas (transiente de  $Ca^{2+}$ ), e ações antagônicas (estado redox da célula) dando uma visão mais aprofundada em como estas duas vias de sinalização interagem nas células cardíacas. A identificação de uma sinalização cruzada entre aldosterona e Ang-(1-7), em condições de ativação tanto GR and MR nos levaram a especular que a angiotensina-(1-7) pode ser capaz de modular o equilíbrio de ações mediadas por MR/GR e além disso interferir diretamente na expressão desses receptores. Estas observações têm implicações terapêuticas importantes, dado o fato de que o receptor de MR é um alvo importante para a prevenção da descompensação da função do coração em pacientes com insuficiência cardíaca. Por exemplo, a função exercida pelo receptor de MR pode ser influenciada pelo estado redox da célula (Rossier e cols., 2008), por esse motivo, é possível que a Ang- (1-7), impedindo o aumento de EROS induzida pela aldosterona possa modular a resposta de MR a corticosteróides. (Ferreira e cols., 2010; Marques e cols., 2011). Além de sua ação antioxidante, a via de produção ON dependente da Ang-(1-7) associada com a sua capacidade para manter a ativação da PKA induzida pela aldosterona, podem conferir a este peptídeo a capacidade de manter a função contrátil em condições de excesso de aldosterona. Além disso, a liberação de  $Ca^{2+}$  anormal durante a diástole tem sido associada com o desenvolvimento de arritmias em modelos de insuficiência cardíaca. Uma potencial implicação das nossas descobertas é o fato de que a Ang-(1-7) através da redução de taxa de frequência de  $Ca^{2+}$  durante a diástole na presença de aldosterona possa proteger o coração contra as arritmias cardíacas que ameaçam a vida.

## 8- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Akazawa, H.; Komuro, I. (2003). Roles of cardiac transcription factors in cardiac hypertrophy. *Circ. Res.*, v. 92, n. 10, p. 1079-88.

Almeida PWM, de Freitas LR, Morais Gomes ER, Rocha-Resende C, Roman-Campos D, Gondim AN, Gavioli M, Lara A, Parreira A, de Azevedo Nunes SL, Alves MN, Santos SL, Alenina N, Bader M, Resende RR, dos Santos CJ, Souza dos Santos RA, Guatimosim S (2013) Functional cross-talk between aldosterone and angiotensin-(1-7) in ventricular myocytes. *Hypertension* 61:425-430.

Almeida PWM; Marcos Melo MB; de Freitas LR; Gavioli M; Santiago NM; Greco L; Jesus ICG; Nocchi E; Parreira AB; Márcia N.M. Alves MNM; Mitraud L; Rodrigo Ribeiro Resende RR; Campagnole-Santos MJ; Souza dos Santos RA; Guatimosim S. Beneficial effects of Angiotensin-(1-7) against DOCA-induced diastolic dysfunction occur independently of changes in blood pressure. *Hypertension* (Dallas, Tex. 1979). (2015).

Almeida, PWM. Mecanismos envolvidos do efeito cardioprotetor da Ang-(1-7) em ratos submetidos ao modelo de hipertensão DOCA-sal. *Dissertação de Mestrado*, Pós-Graduação em Fisiologia e Farmacologia. (2010).

Alves, G. B. (2007). Influence of angiotensinogen and ACE polymorphisms on myocardial hypertrophy and gain of aerobic capacity by exercise training in young individuals. *Thesis (PhD)*, p.123, São Paulo.

Ambrosine, M. L.; Favre, J.; Oliviero, P.; Rodriguez, C.; Gao, J.; Thuillez, C; Samuel, J. L. et al. (2007). Aldosterone-induced coronary dysfunction in transgenic mice involves the calcium-activated potassium (BKCa) channels of vascular smooth muscle cells. *Circulation*, v. 116, p. 2435-2443.

Argañaraz, G. A.; Konno, A. C.; Perosa, S. R.; Santiago, J. F.; Boim, M. A. et al. (2008). The renin-angiotensin system is upregulated in the cortex and hippocampus of patients with temporal lobe epilepsy related to mesial temporal sclerosis. *Epilepsia*, v. 49, n. 8, p. 1348-57.

Arriza, J. L.; Weinberger, C.; Cerelli, G.; Glaser, T. M.; Handelin, B. L.; Housman, D. E.; Evans, R. M. (1987). Cloning of human mineralocorticoid receptor complementary DNA: structural and functional kinship with the glucocorticoid receptor. *Science*, v. 237, p. 268-275.

Balakumar, P.; Jagadeesh, G. (2010). Cardiovascular and renal pathologic implications of prorenin, renin, and the (pro)renin receptor: promising young players from the old renin-angiotensin-aldosterone system. *J Cardiovasc Pharmacol*, v. 56, n. 5, p. 570-579.

Balijepalli, R. C., A. J. Lokuta, N. A. Maertz, J. M. Buck, R. A. Haworth, H. H. Valdivia e T. J. Kamp. Depletion of T-tubules and specific subcellular changes in sarcolemmal proteins in tachycardia-induced heart failure. *Cardiovasc Res*, v.59, n.1, Jul 1, p.67-77. 2003.

Barouch LA, Harrison RW, Skaf MW, Rosas GO, Cappola TP, Kobeissi ZA, Hobai IA, Lemmon CA, Burnett AL, O'Rourke B, Rodriguez ER, Huang PL, Lima JA, Berkowitz DE, & Hare JM (2002). Nitric oxide regulates the heart by spatial confinement of nitric oxide synthase isoforms. *Nature* 416, 337-339.

Belge C, Massion PB, Pelat M, & Balligand JL (2005). Nitric oxide and the heart: update on new paradigms. *Ann N Y Acad Sci* 1047, 173-182.

Benitah JP, Vassort G. Aldosterone upregulates  $Ca^{2+}$  current in adult rat cardiomyocytes. *Circ Res*. 1999;85:1139-1145.

Bernard, K.; Wang, W.; Narlawar, R.; Schmidt, B.; Kirk, K. L. (2009). Curcumin cross-links cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) polypeptides and potentiates CFTR channel activity by distinct mechanisms. *J BiolChem*, v. 284, n. 45, p. 30754-65.

Berridge, M. J. Calcium microdomains: organization and function. *Cell Calcium*, v.40, n.5-6, Nov-Dec, p.405-12. 2006.

Bers D. M. Excitation-contraction coupling and cardiac contractile force. AH Dordrecht: **Kluwer Academic Publishers**, 2002b.

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

Bers, D. M. Calcium cycling and signaling in cardiac myocytes. *Annu Rev Physiol*, v.70, p.23-49. 2008.

Bers, D. M. Cardiac excitation-contraction coupling. *Nature*, v.415, n.6868, Jan 10, p.198-205. 2002a.



Berube, D.; Luu , V.; Lachance, Y.; Gagne, R.; Labrie, F. (1989). Assignment of the human 3 beta-hydroxysteroid dehydrogenase gene (HSDB3) to the p13 band of chromosome 1. **Cytogenetics and Cell Genetics**, v.52, n. 3–4, p. 199–200.

Bing, O. H., C. H. Conrad, M. O. Boluyt, K. G. Robinson e W. W. Brooks. Studies of prevention, treatment and mechanisms of heart failure in the aging spontaneously hypertensive rat. **Heart Fail Rev**, v.7, n.1, Jan, p.71-88. 2002.

Booth RE, Johnson JP, Stockand JD. Aldosterone. **Adv Physiol Educ** 16. 2002;26(1-4):8-20.

Bradford, MM. A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. **Analytical Biochemistry**. 72:248-254. (1976).

Bredt DS (2003). Nitric oxide signaling specificity--the heart of the problem. **J Cell Sci** 116, 9-15.

Brody, T. (1993). **Nutricional Biochemistry .Academic Press**, p. 658 ,Londres.

Brown NJ. Eplerenone: cardiovascular protection. **Circulation**. 2003;107:2512-2518.

Brown, M..J. Direct renin inhibition – a new way of targeting the renin system. (2006). **J Renin Angiotensin Aldosterone Syst**, 7 (suppl 2):S7-S11.

Cachofeiro, V.; Miana, M.; De Las Heras, N.; Martin- Fernández, B.; Ballesteros, S.; Fernández-Tresguerres, J.; Lahera, V. (2008). Aldosterone and the vascular system. **J Steroid Biochem Mo IBiol**, v. 109, p. 331-335.

Callera, G. E.; Touyz, R. M.; Tostes, R. C. et al. (2005). Aldosterone activates vascular p38MAP kinase and NADPH oxidase via c-Src. **Hypertension**, Montreal, v. 45, n. 4, p. 773-779.

Campbell DL, Stamler JS, Strauss HC. Redox Modulation of L-Type calcium channels in Ferret ventricular myocytes. Dual mechanism regulation by nitric oxide and S-nitrosothiols. **Journal of General Physiology**, 108, 277-293, 1996.

Cannell, M. B., H. Cheng e W. J. Lederer. Spatial non-uniformities in [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> during excitation-contraction coupling in cardiac myocytes. **Biophys J**, v.67, n.5, Nov, p.1942-56. 1994.

Capettini LSA ;Cortes SF; Silva JF; Alvarez-Leite JI; Lemos VS. Decreased production of neuronal NOS-derived hydrogen peroxide contributes to endothelial dysfunction in atherosclerosis. **British Journal of Pharmacology**. (2011) 164 1738–1748

Carey, R.M.; Siragy, H. M. (2003).The intrarenalreninangiotensin system and diabetic nephropathy.**Trends EndocrinolMetab**, v. 14, p. 274-281.

Chai W, Garrelds IM, de Vries R, Batenburg WW, van Kats JP, Danser AH (2005) Nongenomic effects of aldosterone in the human heart: interaction with angiotensin II. **Hypertension** 46:701–706.

Cheng, H. & W. J. Lederer. Calcium sparks. **Physiol Rev**, v.88, n.4, Oct, p.1491-545. 2008.

Cheng, H., L. S. Song, N. Shirokova, A. Gonzalez, E. G. Lakatta, E. Rios e M. D. Stern. Amplitude distribution of calcium sparks in confocal images: theory and studies with an automatic detection method. **Biophys J**, v.76, n.2, Feb, p.606-17. 1999.

Cheng, H., M. R. Lederer, W. J. Lederer e M. B. Cannell. Calcium sparks and [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> waves in cardiac myocytes. **Am J Physiol**, v.270, n.1 Pt 1, Jan, p.C148-59. 1996.

Cheng, H., W. J. Lederer e M. B. Cannell. Calcium sparks: elementary events underlying excitation-contraction coupling in heart muscle. **Science**, v.262, n.5134, Oct 29, p.740-4. 1993.

Chen-Izu, Y., L. Chen, T. Banyasz, S. L. McCulle, B. Norton, S. M. Scharf, A. Agarwal, A. Patwardhan, L. T. Izu e C. W. Balke. Hypertension-induced remodeling of cardiac excitation-contraction coupling in ventricular myocytes occurs prior to hypertrophy development. **Am J Physiol Heart Circ Physiol**, v.293, n.6, Dec, p.H3301-10. 2007.

Chomczynski, P.; Sacchi, N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. **Analytical Biochemistry**, v.162, p. 156-159, 1987.

Christ M, Günther A, Heck M, Schmidt BM, Falkenstein E, Wehling M. Aldosterone, not estradiol, is the physiological agonist for rapid increases in cAMP in vascular smooth muscle cells. **Circulation**. 1999;99:1485–1491.

Christ, M.; Eisen, C.; Aktas, J. et al. (1993). The inositol-1,4,5-trisphosphate system is involved in rapid effects of aldosterone in human mononuclear leukocytes. **J. Clin. Endocr.Metab.**, v. 77, p. 1452-1457.

Christ, M.; Douwes, K.; Eisen, C. et al. (1995a). Rapid effects of aldosterone on sodium transport in vascular smooth muscle cells. *Hypertension*, v. 25, p. 117-123.

Christ, M.; Meyer, C.; Sippel, K. et al. (1995b). Rapid aldosterone signaling in vascular smooth muscle cells: involvement of phospholipase C, diacylglycerol and protein kinase C [J]. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, v. 213, p. 123-129.

Chun, T. Y.; Bloem, L. J.; Pratt, J. H. (2003). Aldosterone inhibits inducible nitric oxide synthase in neonatal rat cardiomyocytes. *Endocrinology*, Indianapolis, v. 144, n. 5, p. 1712-1717.

Connell JMC, Davies E. The new biology of aldosterone. *J Endocrinol* 17. 2005;186(1):1-20.

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

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

Danson EJ, Choate JK, & Paterson DJ (2005). Cardiac nitric oxide: emerging role for nNOS in regulating physiological function. *Pharmacol Ther* 106, 57-74.

Dash, R., K. F. Frank, A. N. Carr, C. S. Moravec e E. G. Kranias. Gender influences on sarcoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup>-handling in failing human myocardium. *J Mol Cell Cardiol*, v.33, n.7, Jul, p.1345-53. 2001.

Delcayre C, Silvestre JS, Garnier A, Oubenaissa A, Cailmail S, Tatara E, Swynghedauw B, Robert V. Cardiac aldosterone production and ventricular remodeling. *Kidney Int*. 2000;57:1346-1351.

Di ZA, Nguyen Dinh CA, Soukaseum C, Escoubet B, Cherfa A, Messaoudi S, Delcayre C, Samuel JL, Jaisser F. Cross-talk between mineralocorticoid and angiotensin II signaling for cardiac remodeling. *Hypertension*. 2008;52:1060-1067.

Dias-Peixoto MF, Santos RA, Gomes ER, Alves MN, Almeida PW, Greco L, Rosa M, Fauler B, Bader M, Alenina N, Guatimosim S. Molecular mechanisms involved in the

angiotensin-(1-7)/Mas signaling pathway in cardiomyocytes. **Hypertension**. 2008;52:542-548.

Dooley, R.; Harvey, B. J.; Thomas, W. (2011). The regulation of cell growth and survival by aldosterone. **Frontiers in Bioscience**, v. 16, p. 440-457.

Dorn, G. W., Force, T. Protein kinase cascades in the regulation of cardiac hypertrophy. **J Clin Invest**. London, v.115, n.3, p.527-37, 2005.

Falkenstein, E.; Tilmann, H. C.; Christ, M. et al. (2000). Multiple actions of steroid hormones: a focus on rapid, nongenomic effects. **Pharmacological Reviews**, v. 52, n. 4, p. 513-556.

Fejes-Tóth G, Pearce D, Náray-Feje-Tóth A. Subcellular localization of mineralocorticoid receptors in living cells: Effects of receptor agonists and antagonists. **Proc Natl Acad Sci USA** 1998;95(6):2973-8.

Fernandes-Rosa, L. F; Antonini, R. R. S. (2006). Resistência aos Mineralocorticóides: Pseudo-hipoaldosteronismo tipo 1. **Arq Bras Endocrinol Metab**, v. 51, n. 3, p. 373-381.

Feron O, Belhassen L, Kobzik L, Smith TW, Kelly RA, & Michel T (1996). Endothelial nitric oxide synthase targeting to caveolae. Specific interactions with caveolin isoforms in cardiac myocytes and endothelial cells. **J Biol Chem** 271, 22810-22814.

Feron O, Saldana F, Michel JB, & Michel T (1998). The endothelial nitric-oxide synthase-caveolin regulatory cycle. **J Biol Chem** 273, 3125-3128.

Ferrario CM, Chappel MC, Tallant EA, Brosnihan KB, Diz DI. Counter-regulatory actions of angiotensin-(1-7). **Hypertension**. 27:523-528, 1997.

Ferreira AJ, Castro CH, Guatimosim S, Almeida PWM, Gomes ER, Dias- Peixoto, Alves MNM, Fagundes-Moura CR, Rentzsch B, Gava E, Almeida AP, Guimarães AM, Kitten GT, Reudelhuber T, Bader M and Santos RAS. Attenuation of isoproterenol-induced cardiac fibrosis in transgenic rats harboring an angiotensin-(1-7)-producing fusion protein in the heart. **Ther Adv Cardiovasc Dis**; 4; 83, 2010.

Ferreira AJ, Santos RA, Bradford CN, Mecca AP, Sumners C, Katovich MJ, Raizada MK. Therapeutic implications of the vasoprotective axis of the renin-angiotensin system in cardiovascular diseases. **Hypertension**. 2010;55:207-213.

Ferreira AJ, Santos RAS, Almeida, AP. Angiotensin-(1-7): Cardioprotective Effect in Myocardial Ischemia/Reperfusion. **Hypertension**. 38: 665-668, 2001.

Fraccarollo D, Galuppo P, Schmidt I, Ertl G, Bauersachs J (2005) Additive amelioration of left ventricular remodeling and molecular alterations by combined aldosterone and angiotensin receptor blockade after myocardial infarction. **Cardiovasc Res** 67:97–105.

Frey, N.; Olson, E. N. (2003). Cardiac hypertrophy: the good, the bad, and the ugly. **Annual Review of Physiology**, Dallas, v. 65, p. 45-79.

Funder, J. W.; Pearce, P. T.; Smith, R. et al. (1988). Mineralocorticoid action: target tissue specificity is enzyme, not receptor. **Science**, v. 242, n. 4878, p. 583-585.

Funder, J. W.; Feldman, D.; Edelman, I. S. (1972). Specific aldosterone binding in rat kidney and parotid. **J Steroid Biochem.**, v. 3, n. 2, p. 209-18.

Garcia-Cardena G, Oh P, Liu J, Schnitzer JE, & Sessa WC (1996). Targeting of nitric oxide synthase to endothelial cell caveolae via palmitoylation: implications for nitric oxide signaling. **Proc Natl Acad Sci U S A** 93, 6448-6453.

Giani JF, Gironacci MM, Munoz MC, Pena C, Turyn D & Dominici FP. Angiotensin-(1-7) stimulates the phosphorylation of JAK2, IRS-1 and Akt in rat heart in vivo: role of the AT1 and Mas receptors. **Am J Physiol Heart Circ Physiol**. 293: H1154–H1163, 2007.

Giestas, A.; Palma, I.; Ramos, M. H. (2010). Sistema renina-angiotensina-aldosterona e sua modulação farmacológica. **Acta Med. Port**, v. 23, n. 4, p. 677-688.

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

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

Gomez AM, Rueda A, Sainte-Marie Y, Pereira L, Zissimopoulos S, Zhu X, Schaub R, Perrier E, Perrier R, Latouche C, Richard S, Picot MC, Jaisser F, Lai FA, Valdivia HH, Benitah JP. Mineralocorticoid modulation of cardiac ryanodine receptor activity is associated with downregulation of fk506-binding proteins. **Circulation**. 2009;119:2179–2187.

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

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

Gros R, Ding Q, Sklar LA, Prossnitz EE, Arterburn JB, Chorazyczewski J, Feldman RD. Renin-Angiotensin-Aldosterone System GPR30 Expression Is Required for the Mineralocorticoid Receptor-Independent Rapid Vascular Effects of Aldosterone **Hypertension**. 2011; 57:442-451.

Grossmann, C.; Gekle, M. (2008). New aspects of rapid aldosterona signaling. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 308, p. 53-62.

Grossmann, C.; Gekle, M. (2009). Review: New aspects of rapid aldosterone signaling. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 308, p. 53-62.

Gryglewski RJ, Palmer RM, & Moncada S (1986). Superoxide anion is involved in the breakdown of endothelium-derived vascular relaxing factor. **Nature** 320, 454-456.

Gu Z, Kaul M, Yan B, Kridel SJ, Cui J, Strongin A, Smith JW, Liddington RC, and Lipton SA. S-nitrosylation of matrix metalloproteinases: signaling pathway to neuronal cell death. **Science** 297: 1186- 1190, 2002.

Guatimosim S, Dilly K, Santana LF, Jafri MS, Sobie EA, Lederer WJ. Local Ca<sup>2+</sup> Signaling and EC Coupling in Heart: Ca<sup>2+</sup> Sparks and the Regulation of the [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> Transient. **J Mol Cell Cardiol**. 2002;34:941-950.

Guatimosim, S; Amaya, MJ; Guerra, MT; Aguiar, CJ; Goes, AM; Gómez-Viguez, NL; Rodrigues, MA; Gomes, DA; Martins-Cruz, J; Lederer, WJ; Leite, MF. (2008). Nuclear ca<sup>2+</sup> regulates cardiomyocyte function. **Cell calcium**. 44(2):230-42.

Guatimosim, S; Sobie, EA; Cruz, JS; Martin, LA; Lederer, WJ(2001). Molecular identification of a TTX-sensitive Ca<sup>2+</sup> current. **American Journal of Physiology – Cell Physiology**. 280:C1327-C1339.

Güder G, Bauersachs J, Frantz S, Weismann D, Allolio B, Ertl G, Angermann CE, Störk S. Complementary and incremental mortality risk prediction by cortisol and aldosterone in chronic heart failure. **Circulation**. 2007;115:1754–1761.

Gyorke, I. e S. Gyorke. Regulation of the cardiac ryanodine receptor channel by luminal  $Ca^{2+}$  involves luminal  $Ca^{2+}$  sensing sites. **Biophys J**, v.75, n.6, Dec, p.2801-10. 1998.

Hafezi-Moghadam A, Simoncini T, Yang Z, Limbourg FP, Plumier JC, Rebsamen MC, Hsieh CM, Chui DS, Thomas KL, Prorock AJ, Laubach VE, Moskowitz MA, French BA, Ley K, Liao JK. Acute cardiovascular protective effects of corticosteroids are mediated by non-transcriptional activation of endothelial nitric oxide synthase. **Nat Med**. 2002 May;8(5):473-9.

Harada E, Yoshimura M, Yasue H, Nakagawa O, Nakagawa M, Harada M, Mizuno Y, Nakayama M, Shimasaki Y, Ito T, Nakamura S, Kuwahara K, Saito Y, Nakao K, Ogawa H (2001) Aldosterone induces angiotensin-converting-enzyme gene expression in cultured neonatal rat cardiocytes. **Circulation** 104:137–139.

Hare JM & Stamler JS (2005). NO/redox disequilibrium in the failing heart and cardiovascular system. **J Clin Invest** 115, 509-517.

Hare JM (2003). Nitric oxide and excitation-contraction coupling. **J Mol Cell Cardiol** 35, 719- 729.

Hare JM (2004a). Spatial confinement of isoforms of cardiac nitric-oxide synthase: unraveling the complexities of nitric oxide's cardiobiology. **Lancet** 363, 1338-1339.

Hare JM (2004b). Nitroso-redox balance in the cardiovascular system. **N Engl J Med** 351, 2112-2114.

Hare JM, Lofthouse RA, Juang GJ, Colman L, Ricker KM, Kim B, Senzaki H, Cao S, Tunin RS, & Kass DA (2000). Contribution of caveolin protein abundance to augmented nitric oxide signaling in conscious dogs with pacing-induced heart failure. **Circ Res** 86, 1085-1092.

Hasenfuss, G. Alterations of calcium-regulatory proteins in heart failure. **Cardiovasc Res**, v.37, n.2, Feb, p.279-89. 1998.

Haseroth, K.; Gerdes, D.; Berger, S. et al. (1999). Rapid nongenomic effects of aldosterone in mineralocorticoid-receptor-knockout mice. **BiochemBiophys Res**

**Commun**, v. 266, n .1, p. 257-261.

Heineke, J.; Molkentin, J. D. (2006). Regulation of cardiac hypertrophy by intracellular signaling pathways. **Nature reviews**. Molecular Cell Biology, London, v. 7, n. 8, p. 589-600.

Houser, S. R., V. Piacentino e J. Weisser. Abnormalities of calcium cycling in the hypertrophied and failing heart. **J Mol Cell Cardiol**, v.32, n.9, Sep, p.1595-607. 2000.

Jaffe IZ, Mendelsohn ME (2005) Angiotensin II and aldosterone regulate gene transcription via functional mineralocorticoid receptors in human coronary artery smooth muscle cells. **Circ Res** 96:643–650.

Kaab, S., J. Dixon, J. Duc, D. Ashen, M. Nabauer, D. J. Beuckelmann, G. Steinbeck, D. McKinnon e G. F. Tomaselli. Molecular basis of transient outward potassium current downregulation in human heart failure: a decrease in Kv4.3 mRNA correlates with a reduction in current density. **Circulation**, v.98, n.14, Oct 6, p.1383-93. 1998.

Kalinowski L & Malinski T (2004). Endothelial NADH/NADPH-dependent enzymatic sources of superoxide production: relationship to endothelial dysfunction. **Acta Biochim Pol** . 51, 459-469.

Kanai AJ, Pearce LL, Clemens PR, Birder LA, VanBibber MM, Choi SY, de Groat WC, & Peterson J (2001). Identification of a neuronal nitric oxide synthase in isolated cardiac mitochondria using electrochemical detection. **Proc Natl Acad Sci U S A** 98, 14126-14131.

Keidar S, Kaplan M, Gamliel-Lazarovich A. ACE2 of the heart: From angiotensin I to angiotensin (1-7). **Cardiovasc Res**. 2007;73:463-469.

Kemi, O. J., O. Ellingsen, G. L. Shith e U. Wisloff. Exercise-induced changes in calcium handling in left ventricular cardiomyocytes. **Front Biosci**, v.13, p.356-68. 2008.

Khan SA, Lee K, Minhas KM, Gonzalez DR, Raju SV, Tejani AD, Li D, Berkowitz DE, & Hare JM (2004). Neuronal nitric oxide synthase negatively regulates xanthine oxidoreductase inhibition of cardiac excitation-contraction coupling. **Proc Natl Acad Sci U S A** 101, 15944- 15948.

Khan SA, Skaf MW, Harrison RW, Lee K, Minhas KM, Kumar A, Fradley M, Shoukas AA, Berkowitz DE, & Hare JM (2003). Nitric oxide regulation of myocardial contractility



and calcium cycling: independent impact of neuronal and endothelial nitric oxide synthases. **Circ Res** 92, 1322-1329.

Kinugawa S, Huang H, Wang Z, Kaminski PM, Wolin MS, & Hintze TH (2005). A defect of neuronal nitric oxide synthase increases xanthine oxidase-derived superoxide anion and attenuates the control of myocardial oxygen consumption by nitric oxide derived from endothelial nitric oxide synthase. **Circ Res** 96, 355-362.

Kohr MJ, Wang H, Wheeler DG, Velayutham M, Zweier JL, Ziolo MT. Biphasic effect of SIN-1 is reliant upon cardiomyocyte contractile state. **Free Radic Biol Med** 2008;45(1):73–80. (A)

Kohr MJ, Wang H, Wheeler DG, Velayutham M, Zweier JL, Ziolo MT. Targeting of phospholamban by peroxyntirite decreases {beta}-adrenergic stimulation in cardiomyocytes. **Cardiovasc Res** 2008;77(2):353–61.(B)

Kokoz YM, Grushin KS, Nenov MN, Dynnik VV, Semushina SG, Pakhomova IA, Murashev AN. Control of the L-type Ca<sup>2+</sup> current by the NO-cGMP cascade in isolated cardiomyocytes of normotensive and spontaneously hypertensive rats. **Dokl Biochem Biophys**.415:170-3, 2007.

Korichneva, I.; Pucéat, M.; Millanvoye-Van Brussel, E. et al. (1995). Aldosterone modulates both the Na/H antiport and Cl/HCO<sub>3</sub> exchanger in cultured neonatal rat cardiac cells. **J Mol Cell Cardiol**, v. 27, n. 11, p. 2521-2528.

Krug, A. W. (2003). Aldosterone stimulates epidermal growth factor receptor expression. **J Biol Chem**, v. 278, n. 44, p. 43060-43066.

Krug, A.W.; Grossmann, C.; Schuster, C.; Freudinger, R.; Mildemberger, S.; Govindan, M. V.; Gekle, M. (2006). Aldosterone stimulates epidermal growth factor receptor expression. **J Biol Chem**., v. 278, p. 43060–43066.

Kuster, G. M.; Kotlyar, E.; Rude, M. K. et al. (2005). Mineralocorticoid receptor inhibition ameliorates the transition to myocardial failure and decreases oxidative stress and inflammation in mice with chronic pressure overload. **Circulation**, v. 111, n. 4, p. 420-427.

Lachance, Y.; Luu, V.; Verreault, H.; Dumont, M.; Rheaume, É.; Leblanc, G. et al. (1991). Structure of the human type II 3 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase/ $\Delta^5$ - $\Delta^4$  isomerase (3 $\beta$ -HSD) gene: Adrenal and gonadal specificity.

**DNA and Cell Biology**, v. 10, n. 10, p. 701-711.

Lacombe, V. A., S. Viatchenko-Karpinski, D. Terentyev, A. Sridhar, S. Emani, J. D. Bonagura, D. S. Feldman, S. Gyorke e C. A. Carnes. Mechanisms of impaired calcium handling underlying subclinical diastolic dysfunction in diabetes. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol**, v.293, n.5, Nov, p.R1787-97. 2007.

Lambeth, J. D.; Seybert, D. W.; Lancaster, J. R. Jr.; Salerno, J. C.; Kamin, H. (1982). Steroidogenic electron transport in adrenal cortex mitochondria. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v. 45, p. 13-31.

Lara, A; Damasceno, DD; Pires, R; Gros, R; Gomes, ER; Gavioli, M; Lima, RF, Guimarães, D; Lima, P; Bueno JR, Vasconcelos, A; Roman-campos, D; Menezes, CA; Sirvente, RA; Salemi, VM; Mady, C; Caron, MG; Ferreira, AJ; Brum, PC; Resende, RR; Cruz, JS; Gomez, MV; Prado, VF; Almeida, AP; Prado, MA; Guatimosim, S (2010). Dysautonomia due to reduced cholinergic neurotransmission causes cardiac remodeling and heart failure. **Molecular and Cellular Biology**, 30(7):1746-1756.

Le Moellic, C.; Ouvrard-Pascaud, A.; Capurro, C.; Cluzeaud, F.; Fay, M.; Jaisser, F.; Farman, N.; Blot-Chaubaud, M. (2004). Early nongenomic events in aldosterone action in renal collecting duct cells: PKC $\alpha$  activation, mineralocorticoid receptor phosphorylation, and cross-talk with the genomic response. **J. Am. Soc. Nephrol**, v. 15, p.1145-1160.

Lemarie CA, Paradis P, Schiffrin EL (2008) New insights on signaling cascades induced by cross-talk between angiotensin II and aldosterone. **J Mol Med** 86:673–678.

Li Y, Wu J, He Q, Shou Z, Zhang P, Pen W, Zhu Y, Chen. J. Angiotensin (1-7) prevent heart dysfunction and left ventricular remodeling caused by renal dysfunction in 5/6 nephrectomy mice. **Hypertens Res**. 2009 May;32(5):369-74.

Lieberman, S.; Lin, Y. Y. (2001). Reflections on sterol sidechain cleavage process catalyzed by cytochrome P450(scc). **Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology**, v. 78, p. 1-14.

Lombès, M.;Oblin, M. E.; Gasc, J. M.; Baulieu, E. E.; Farman, N.; Bonvalet, J. P. (1992). Immunohistochemical and biochemical evidence for a cardiovascular mineralocorticoid receptor. **Circ Res.**, v. 71, n. 3, p. 503-10.

Loot AE, Roks AJ, Henning RH, Tio RA, Suurmeijer AJ, Boomsma F, van Gilst WH. Angiotensin-(1-7) attenuates the development of heart failure after myocardial infarction in rats. **Circulation**. 2002;105:1548-1550.

Losel, R. M. (2003). Nongenomic steroid action: controversies, questions, and answers. **Physiol Rev**, v. 83, n. 3, p. 965-1016.

Mano, A.; Tatsumi, T.; Shiraishi, J. et al. (2004). Aldosterone directly induces myocyte apoptosis through calcineurin-dependent pathways. **Circulation**, v. 110, n. 3, p. 317-323.

Marks, A. R., S. Priori, M. Memmi, K. Kontula e P. J. Laitinen. Involvement of the cardiac ryanodine receptor/calcium release channel in catecholaminergic polymorphic ventricular tachycardia. **J Cell Physiol**, v.190, n.1, Jan, p.1-6. 2002.

Marques FD, Ferreira AJ, Sinisterra RD, Jacoby BA, Sousa FB, Caliari MV, Silva GA, Melo MB, Nadu AP, Souza LE, Irigoyen MC, Almeida AP, Santos RA. An oral formulation of angiotensin-(1-7) produces cardioprotective effects in infarcted and isoproterenol-treated rats. **Hypertension**. 2011;57:477-483.

Marver, D.; Stewart, J.; Funder, J. W.; Feldman, D.; Edelman, I. S. (1974). Renal aldosterone receptors: studies with (3H) aldosterone and the anti-mineralocorticoid (3H) spiro lactone (SC-26304). **Proc Natl Acad Sci U S A.**, v.71, n. 4, p. 1431-5.

Marver, D.; Kokko, J. P. (1983). Renal target sites and the mechanism of action of aldosterone. **Miner. Electrolyte Metab.**, v.9, n. 1, p. 1-18.

Mason, J. I. (1993). The 3-hydroxysteroid dehydrogenase gene family of enzymes. **Trends in Endocrinology and Metabolism**, v. 4, p. 199–203.

Massion PB, Feron O, Dessy C, Balligand J-L. Nitric oxide and cardiac function: ten years after and continuing. **Circulation Research**, 93, 388-98, 2003.

Mazak, I.; Fiebeler, A.; Muller, D. N. et al. (2004). Aldosterone potentiates angiotensin II-induced signaling in vascular smooth muscle cells. **Circulation**, v. 109, p. 2792-2800.

Medhurst, A.D.; Harrison, D.C.; Read, S.J.; Campbell, C.A.; Robbins, M.J.; Pangalos, M.N. The use of TaqMan RT-PCR assays for semiquantitative analysis of gene

expression in CNS tissues and disease models. *J Neurosci Methods*, v.15, p.9-20, 2000.

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

Mitra, R.; Morad, M. A uniform enzymatic method for myocytes from hearts and stomachs of vertebrates. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. v.249, p. H1056- H1060, 1985.

Mohiuddin I, Chai H, Lin PH, Lumsden AB, Yao Q, Chen C (junio de 2006). «Nitrotyrosine and chlorotyrosine: clinical significance and biological functions in the vascular system». *J. Surg. Res*. 133 (2): 143–9.

Molkentin, J. D. (2000). The MEK1- ERK1/2 signaling pathway promotes compensates cardiac hypertrophy in transgenic mice. *EMBO Journal*, v. 19, n. 23, p. 6341-50.

Moniotte S, Kobzik L, Feron O, Trochu JN, Gauthier C, & Balligand JL (2001). Upregulation of beta(3)-adrenoceptors and altered contractile response to inotropic amines in human failing myocardium. *Circulation* 103, 1649-1655.

Morgan, L.; Pipkin, F. B; Kalsheker, N. (1996).Angiotensinogen:molecular biology, biochemistry and physiology.Int. *Journal Biochemistry Cell Biology*, v. 28, n. 11, p. 1211-1122.

Morimoto A, Hasegawa H, Cheng HJ, Little WC, & Cheng CP (2004). Endogenous beta3- adrenoreceptor activation contributes to left ventricular and cardiomyocyte dysfunction in heart failure. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 286, H2425-H2433.

Mornet, E.; Dupont, J.; Vitek, A.; White, P. C. (1989).Characterization of two genes encoding human steroid 11-beta-hydroxylase (P-450(11)  $\beta$ ). *J. Biol. Chem.*, v. 264, p. 20961–20967.

Morrison, D. K. (1990). The Raf-1 kinase as a transducer of mitogenic signals. *Cancer Cells*, v. 2, n.12, p. 377-82.

Moura, A. M.; Worcel, M. (1984).Direct action of aldosterone on transmembrane 22 Na efflux from arterial smooth muscle. Rapid and delayed effects. *Hypertension*, v. 6, p. 425- 430.

Nagata, K.;Obata, K.; Xu, J. et al. (2006). Mineralocorticoid receptor antagonism attenuates cardiac hypertrophy and failure in low-aldosterone hypertensive rats. **Hypertension**, v. 47, n. 4, p. 634-635.

Nelson D. L.; Cox, M. M. (2006) **Lehninger princípios de bioquímica**. Tr. Simões AA, Lodi WRN. 4 ed, São Paulo: Sarvier.

Nishiyama, A.;Yao, L.;Fan. Y.;Kyaw, M,Kataoka, N.;Hashimoto, K.;Nagai, Y.;Nakamura, E.;Yoshizumi, M.;Shokoji, T.;Kimura, S.;Kiyomoto, H.;Tsujioka, K.;Kohno, M.; Tamaki, T.;Kajiya, F.;Abe, Y. (2005). Involvement of aldosterone and mineralocorticoid receptors in rat mesangial cell proliferation and deformability. **Hypertension**, v. 45, n.4, p. 710-6.

Odermatt A, Arnold P, Frey FJ. The intracellular localization of the mineralocorticoid receptor is regulated by 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 2. **J Biol Chem**. 2001;276 (30):28484-92.

Okamoto T, Akaike T, Sawa T, Miyamoto Y, van der Vliet A, and Maeda H. Activation of matrix metalloproteinases by peroxynitrite-induced protein S-glutathiolation via disulfide S-oxide formation. **J Biol Chem** 276: 29596–29602, 2001.

Oliveira FA,Guatimosim S,Castro CH,GalanDT,Lauton-SantosS,Ribeiro AM, Almeida AP, Cruz JS. Abolition of reperfusion-induced arrhythmias in hearts from thiamine-deficient rats. **Am J Physiol Heart Circ Physiol**. 2007;293:H394-H401.

O'Malley, B. (2008). The Year in Basic Science: nuclear receptors and coregulators. **Mol Endocrinol**. V. 22, n.12, p. 2751-8.

Orshal, J. M.; Khalil, R. A. (2004).Gender, sex hormones, and vascular tone. **AJP: Regul. Integr.Comp. Physiol.**, v. 286, p. R233–R249.

Paolucci N, Ekelund UE, Isoda T, Ozaki M, Vandegaer K, Georgakopoulos D, et al. cGMP-independent inotropic effects of nitric oxide and peroxynitrite donors: potential role for nitrosylation. **Am J Physiol Heart Circ Physiol** 2000;279(4): H1982–8.

Park JB, Schiffrin EL. Cardiac and vascular fibrosis and hypertrophy in aldosterone-infused rats: role of endothelin-1. **Am J Hypertens**. 2002;15:164-169.

Pascual-Le Tallec, L.; Lombès, M. (2005). The mineralocorticoid receptor: a journey exploring its diversity and specificity of action. **MolEndocrinol**. v. 19, n.9, p. 2211-21.

Paulus WJ & Bronzwaer JG (2004). Nitric oxide's role in the heart: control of beating or breathing? *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 287, H8-13.

Perrier R, Richard S, Sainte-Marie Y, Rossier BC, Jaisser F, Hummler E, Benitah JP. A direct relationship between plasma aldosterone and cardiac L-type Ca<sup>2+</sup> current. *J Physiol*. 2005; 569: 153–162.

Petroff MG, Kim SH, Pepe S, Dessy C, Marbán E, Balligand JL, Sollott SJ. Endogenous nitric oxide mechanisms mediate the stretch dependence of Ca<sup>2+</sup> release in cardiomyocytes. *Nat Cell Biol*. 3: 867-73, 2001.

Philipson, K.D. and Nicoll, D.A. (2000). Sodium-Calcium Exchange: A Molecular Perspective. *Ann. Rev. Physiol* 62: 111-133

Piacentino, V., 3rd, C. R. Weber, X. Chen, J. Weisser-Thomas, K. B. Margulies, D. M. Bers e S. R. Houser. Cellular basis of abnormal calcium transients of failing human ventricular myocytes. *Circ Res*, v.92, n.6, Apr 4, p.651-8. 2003.

Picht, E., A. V. Zima, L. A. Blatter e D. M. Bers. SparkMaster: automated calcium spark analysis with ImageJ. *Am J Physiol Cell Physiol*, v.293, n.3, Sep, p.C1073-81. 2007.

Pogwizd, S. M., K. Schlotthauer, L. Li, W. Yuan e D. M. Bers. Arrhythmogenesis and contractile dysfunction in heart failure: Roles of sodium-calcium exchange, inward rectifier potassium current, and residual beta-adrenergic responsiveness. *Circ Res*, v.88, n.11, Jun 8, p.1159-67. 2001.

Porter, G.A.; Bogoroch, R.; Edelman, I.S.(1964). On the mechanism of action of aldosterone on sodium transport: the role of RNA synthesis. *ProcNatlAcadSci U S A*, v. 52, p. 1326-33.

Prosser BL W. Ward CW ,Lederer WJ. X-ROS Signaling: Rapid Mechano-Chemo Transduction in Heart. *Science* 9 September 2011: Vol. 333 no. 6048 pp. 1440-1445.  
Sipido, K. R., P. G. Volders, M. A. Vos e F. Verdonck. Altered Na/Ca exchange activity in cardiac hypertrophy and heart failure: a new target for therapy? *Cardiovasc Res*, v.53, n.4, Mar, p.782-805. 2002.

Rao, M. S. (2010). Inhibition of the renin angiotensin aldosterone system: focus on aliskiren. *J. Assoc. Physicians*. India., v. 58, p. 102-108.

Rautureau Y, Paradis P, Schiffrin EL (2011) Cross-talk between aldosterone and angiotensin signaling in vascular smooth muscle cells. *Steroids* 76:834–839.

Resende, R.R.; Gomes, K.N.; Adhikari, A.; Britto, L.R.; Ulrich, H. Mechanism of acetylcholine-induced calcium signaling during neuronal differentiation of P19 embryonal carcinoma cells in vitro. **Cell calcium**, v.43, p.107-121, 2008.

Resende, R.R.; Yuahasi, K.K.; Majumder P.; Ulrich, H. Delivery systems of nucleic acids drugs for in vivo use. **Drug Target Insights**, v.2, p.183-196, 2007.

Reudelhuber, T. L. (2005). The continuing saga of the AT<sub>2</sub> receptor: a case of the good, the bad, and the innocuous. **Hypertension**, v. 46, n. 6, p. 1261–1262.

Robert T, Per, BG: The kidneys and the circulation. **Scand Arch Physiol** 8: 223-270, 1898, as translated by Ruskin A. *In* Classics in Arterial Hypertension, Springfield, Ill,cCharles C Thomas, 1956, pp 273

Roman-CamposD,Duarte HL,Gomes ER,Castro CH,Guatimosim S,Natali AJ, Almeida AP, Pesquero JB, Pesquero JL, Cruz JS. Investigation of the cardiomyocyte dysfunction in bradykinin type 2 receptor knockout mice. **Life Sci**. 2010;87:715-723.

Rossier MF, Lenglet S, Vetterli L, Python M, Maturana A. Corticosteroids and redox potential modulate spontaneous contractions in isolated rat ventricular cardiomyocytes. **Hypertension**. 2008;52:721-728.

Rossier MF, Python M, Maturana AD. Contribution of mineralocorticoid and glucocorticoid receptors to the chronotropic and hypertrophic actions of aldosterone in neonatal rat ventricular myocytes. **Endocrinology**. 2010;151:2777-2787.

Rude, M. K.; Duhnaney, T. A.; Kuster, G. M. et al. (2005). Aldosterone stimulates matrix metalloproteinases and reactive oxygen species in adult rat ventricular cardiomyocytes. **Hypertension**, v. 46, n.3, p. 555-561.

Sakai RR, McEwen BS, Fluharty SJ, Ma LY. The amygdala: Site of genomic 18. and nongenomic arousal of aldosterone-induced sodium intake. **Kidney Int** 2000;57(4):1337-45.

Santana, L. F., E. G. Kranias e W. J. Lederer. Calcium sparks and excitation-contraction coupling in phospholamban-deficient mouse ventricular myocytes. **J Physiol**, v.503 ( Pt 1), Aug 15, p.21-9. 1997.

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

Santos, R. A.; Castro, C. H.; Gava, E.; Pinheiro, S. V.; Almeida A. P.; Paula, R. D.; Cruz, J. S.; Ramos, A. S.; Rose, K. T.; Irigoyen, M. C.; Bader, M.; Alenina, N.; Kitten, G. T.; Ferreira, A. J. Impairment of in vitro and in vivo heart function in angiotensin-(1-7) receptor MAS knockout mice. *Hypertension*, New York, v.47, n.5, p.996-1002, 2006.

Santos RAS, Brum JM, Brosnihan KB, Ferrario CM: The renin angiotensin system during acute myocardial ischemia in dogs. *Hypertension* 15(Suppl. 2): I121-I127, 1990.

Santos RAS, Ferreira AJ, Nadu AP, Braga ANG, Almeida AP, Campagnole- Santos MJ, Baltatu O, Iliescu R, Reudelhuber TL and Bader M. Expression of an angiotensin-(1-7) producing fusion protein produces cardioprotective effects in rats. *Physiol Genomics*. 17:292– 9, 2004.

Sartori C, Lepori M, & Scherrer U (2005). Interaction between nitric oxide and the cholinergic and sympathetic nervous system in cardiovascular control in humans. *Pharmacol Ther* 106, 209- 220.

Sawicki G, Leon H, Sawicka J, Sariahmetoglu M, Schulze CJ, Scott PG, Szczesna-Cordary D, and Schulz R. Degradation of myosin light chain in isolated rat hearts subjected to ischemia-reperfusion injury: a new intracellular target for matrix metalloproteinase-2. *Circulation* 112: 544– 552, 2005.

Schnabel RB, Larson MG, Yamamoto JF, Sullivan LM, Pencina MJ, Meigs JB, Tofler GH, Selhub J, Jacques PF, Wolf PA, Magnani JW, Ellinor PT, Wang TJ, Levy D, Vasan RS, Benjamin EJ. Relations of biomarkers of distinct pathophysiological pathways and atrial fibrillation incidence in the community. *Circulation*. 2010;121:200–207.

Shedden, E. A.; Wargent, E. T.; Ashton, N. et al. (2002). Rapid stimulation of cyclic AMP production by aldosterone in rat inner medullary collecting ducts. *J. Endocrinol.*, v. 175, p. 343-347.

Sheppard KE. Corticosteroid receptors, 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase, and



the heart. **Vitam Horm.** 2003;66:77-112.

Shinyashiki M, Pan CJ, Lopez BE, & Fukuto JM (2004). Inhibition of the yeast metal reductase heme protein fre1 by nitric oxide (NO): a model for inhibition of NADPH oxidase by NO. **Free Radic Biol Med** 37, 713-723.

Shinzawa, K.; Ishibashi, S.; Murakoshi, M.; Watanabe, K.; Kominami, S.; Kawahar, A.; Takemori, S. (1988) Relationship between zonal distribution of microsomal cytochrome P450s (P45017 $\alpha$ , lyase and P450c21) and steroidogenic activities in guinea pig adrenal cortex. **J Endocrinol**, v. 119, p. 191–200.

Simard, J.; Rhéaume, E.; Sanchez, R.; Laflamme, N.; Launoit, Y.; Luu-The, V. et al.(1993). Molecular basis of congenital adrenal hyperplasia due to 3 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase deficiency. **MolEndocrinol** ,v. 7, p. 716-28.

Simmerman, H. K., J. H. Collins, et al. Sequence analysis of phospholamban. Identification of phosphorylation sites and two major structural domains. **J Biol Chem**, v.261, n.28, Oct 5, p.13333-41. 1986.

Simpson, S. A.; Tait, J. F.; Wettstein, A. et al. (1954).Constitution of aldosterona, a new mineralocorticoide.**Experientia**, v. 10, n. 3, p. 132-133.

Smith RS, Jr., Agata J, Xia CF, Chao L, & Chao J (2005). Human endothelial nitric oxide synthase gene delivery protects against cardiac remodeling and reduces oxidative stress after myocardial infarction. **Life Sci** 76, 2457-2471.

Song, L. S., E. A. Sobie, S. McCulle, W. J. Lederer, C. W. Balke e H. Gheng. Orphaned ryanodine receptors in the failing heart. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v.103, n.11, Mar 14, p.4305-10. 2006.

Spach, C.; Streeten, D. H. (1964). Retardation of sodium exchange in dog erythrocytes by physiological concentrations of aldosterone, in vitro. **J.Clin. Invest.**, v. 43, p. 217–227.

Stamler JS, Lamas S, & Fang FC (2001). Nitrosylation. the prototypic redox-based signaling mechanism. **Cell** 106, 675-683.

Stas S, Whaley-Connell A, Habibi J, Appesh L, Hayden MR, Karuparthi PR, Qazi M, Morris EM, Cooper SA, Link CD, Stump C, Hay M, Ferrario C, Sowers JR (2007) Mineralocorticoid receptor blockade attenuates chronic overexpression of the renin-angiotensin-aldosterone system stimulation of reduced nicotinamide adenine

dinucleotide phosphate oxidase and cardiac remodeling. **Endocrinology** 148:3773–3780.

Stojanovic MO, Ziolo MT, Wahler GM, Wolska BM. Anti-adrenergic effects of nitric oxide donor SIN-1 in rat cardiac myocytes. **Am J Physiol Cell Physiol**. 2001;281(1):C342–9.

Stowasser, M.; Sharman, J.; Leano, R.; Gordon, R.D.; Ward, G.; Cowley, D.; Marwick, T.H. (2005). Evidence for abnormal left ventricular structure and function in normotensive individuals with familial hyperaldosteronism Type I. **J. Clin.Endocrinol.Metab.**, v. 90 , n. 9, p. 5070-5076.

Struthers AD. The clinical implications of aldosterone escape in congestive heart failure. **Eur J Heart Fail**. 2004;6:539-545.

Sun J, Picht E, Ginsburg KS, Bers DM, Steenbergen C, & Murphy E (2006). Hypercontractile female hearts exhibit increased S-nitrosylation of the L-type Ca<sup>2+</sup> channel alpha1 subunit and reduced ischemia/reperfusion injury. **Circ Res** 98, 403-411.

Sun J, Xin C, Eu JP, Stamler JS, & Meissner G (2001). Cysteine-3635 is responsible for skeletal muscle ryanodine receptor modulation by NO. **Proc Natl Acad Sci U S A** 98, 11158-11162.

Sun Y, et al. Aldosterone-induced inflammation in the rat heart: role of oxidative stress. **Am J Pathol**. 2002; 161:1773–1781.

Swedberg K, Eneroth P, Kjeksus J, Wilhelmsen L. Hormones regulating cardiovascular function in patients with severe congestive heart failure and their relation to mortality. CONSENSUS Trial Study Group. **Circulation**. 1990;82:1730-1736.

Takeda, Y.; Miyamori, I.; Yoneda, T. et al. (1995). Production of aldosterone in isolated rat blood vessels. **Hypertension**, v. 25, n. 2, p. 170-173.

Tallant EA, Ferrario CM, Gallagher PE. Angiotensin-(1-7) inhibits growth of cardiac myocytes through activation of the mas receptor. **Am J Physiol Heart Circ Physiol**. 2005 ;289:H1560-1566.

Touyz, R. M. (2003). Recent advances in intracellular signaling in hypertension. ***Curr Opin Nephrol Hypertens***, v. 12, n. 2, p. 165-174.

Walther, T., Balschun, D., Voigt, J.P., Fink, H., Zuschratter, W., Birchmeier, C., Ganten, D. & Bader, M. (1998). Sustained longterm potentiation and anxiety in mice lacking the Mas protooncogene. ***Journal of Biological Chemistry***, 273, 11867—11873.

Wang H, Kohr MJ, Traynham CJ, Wheeler DG, Janssen PM, Ziolo MT. Neuronal nitric oxide synthase signaling within cardiac myocytes targets phospholamban. ***Am J Physiol Cell Physiol***. 294:C1566-75, 2008.

Wang W, Sawicki G, Schulz R. Peroxynitrite-induced myocardial injury is mediated through matrix metalloproteinase-2. ***Cardiovascular Research***. 53(2002)165-174.

Wang W, Schulze CJ, Suarez-Pinzon WL, Dyck JR, Sawicki G, and Schulz R. Intracellular action of matrix metalloproteinase-2 accounts for acute myocardial ischemia and reperfusion injury. ***Circulation*** 106: 1543– 1549, 2002.

Wasserstrom, J. A., R. Sharma, S. Kapur, J. E. Kelly, A. H. Kadish e C. W. Balke. Multiple defects in intracellular calcium cycling in whole failing rat heart. *Circ Heart Fail*, v.2, n.3, May, p.223-32. 2009. Weber, K. T. Cardioreparation in hypertensive heart disease. ***Hypertension***, v.38, n.3 Pt 2, Sep, p.588-91. 2001.

Wehling, M.; Kuhls, S.; Armanini, D. (1989).Volume regulation of human lymphocytes by aldosterone in isotonic media. ***Am. J. Physiol.***, v. 257, p. 170-174.

Wehling, M.; Neylon, C. B.; Fullerton, M. et al. (1995).Nongenomic effects of aldosterone on intracellular Ca<sup>2+</sup> in vascular smooth muscle cells. ***Circ Res***, v. 76, n. 6, p. 973-979.

Wehling, M.; Ulsenheimer, A.; Schneider, M. et al. (1994). Rapid effects of aldosterone on free intracellular calcium in vascular smooth muscle and endothelial cells: subcellular localization of calcium elevations by single cell imaging. ***Biochem.Biophys. Res. Commun.***, v. 204, p. 475-481.

Wehrens, X. H., S. E. Lehnart, et al. Ryanodine receptor/calcium release channel PKA phosphorylation: a critical mediator of heart failure progression. ***Proc Natl Acad Sci U S A***, v.103, n.3, Jan 17, p.511-8. 2006.

Wenzel S, Tastan I, Abdallah Y, Schreckenber R, Schlüter KD. Aldosterone improves

contractile function of adult rat ventricular cardio- myocytes in a non-acute way: potential relationship to the calcium para- dox of aldosteronism. **Basic Res Cardiol.** 2010;105:247–256.

White, P.C. (1986) New MI and Dupont B Structure of the human steroid 21-hydroxylase genes.**ProcNatlAcadSci USA.**

Wickenden, A. D., P. Lee, R. Sah, Q. Huang, G. I. Fishman e P. H. Backx. Targeted expression of a dominant-negative K(v)4.2 K(+) channel subunit in the mouse heart. **Circ Res**, v.85, n.11, Nov 26, p.1067-76. 1999.

Williams, J. S.; Williams, G. H. (2003).50th anniversary of aldosterona. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 88, n. 6, p. 2364-2372.

Xiong, W., Y. Tian, D. DiSilvestre e G. F. Tomaselli. Transmural heterogeneity of Na<sup>+</sup>-Ca<sup>2+</sup> exchange: evidence for differential expression in normal and failing hearts. **Circ Res**, v.97, n.3, Aug 5, p.207-9. 2005.

Xu L, Eu JP, Meissner G, & Stamler JS (1998). Activation of the cardiac calcium release channel (ryanodine receptor) by poly-S-nitrosylation. **Science** 279, 234-237.

Xu L, Eu JP, Meissner G, & Stamler JS (1998). Activation of the cardiac calcium release channel (ryanodine receptor) by poly-S-nitrosylation. **Science** 279, 234-237.

Yang, J.; Chang, C. Y.; Safi, R. et al. (2010).Identification of Ligand-Selective Peptide Antagonists of the Mineralocorticoid Receptor Using Phage Display. **MolEndocrinol**, v. 24, p. 32-43.

Zahradnikova A, Minarovic I, Venema RC, Meszaros LG. Inactivation of the cardiac ryanodine receptor calcium release channel by nitric oxide. **Cell Calcium**, 22, 447-454, 1997.

Zennaro, R. G. .(1995). Extracardiovascular toxic effects of drugs used in cardiology. **Cardiologia**, v. 40 (12 Suppl1), p. 99-104.

Zhu, Y.; Rice, C. D.; Pang, Y.; Pace, M.; Thomas, P. (2003). Cloning, expression, and characterization of a membrane progesterin receptor and evidence it is an intermediary in meiotic maturation of fish oocytes. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.**, v. 100, 2231–2236.

Ziolo MT, Kato H, Bers DM. Positive and negative effects of nitric oxide on Ca<sup>2+</sup> sparks: influence of beta-adrenergic stimulation. **Am J Physiol Heart Circ Physiol.** 2001;281:H2295-H2303.

Ziolo MT, Kohr MJ, Wang H. Nitric oxide signaling and the regulation of myocardial function. ***J Mol Cell Cardiol*** 2008;45(5):625–32.

ANEXO 1 :

Artigo –

ALMEIDA, P. W. M.; DE FREITAS LIMA, R.; DE MORAIS GOMES, E. R.; ROCHA-RESENDE, C.; ROMAN-CAMPOS, D.; GONDIM, A. N. S.; GAVIOLI, M.; LARA, A.; PARREIRA, A.; DE AZEVEDO NUNES, S. L.; ALVES, M. N. M.; SANTOS, S. L.; ALENINA, N.; BADER, M.; RESENDE, R. R.; DOS SANTOS CRUZ, J.; DOS SANTOS, R. A. S.; GUATIMOSIM, S. **Functional Cross-Talk Between Aldosterone and Angiotensin-(1-7) in Ventricular Myocytes**. Hypertension (Dallas, Tex. 1979). 2013; 61:425-430. ; originally published online December 10, 2012; doi: 10.1161/HYPERTENSIONAHA.111.199539.

ANEXO 2 :

Artigo –

PEDRO W. MACHADO DE ALMEIDA; MARCOS BARROUIN MELO; RICARDO DE FREITAS LIMA; MARIANA GAVIOLI; NIVIA M. SANTIAGO; LEONARDO GRECO; ITAMAR C.G. JESUS; EDUARDO NOCCHI; AMANDA PARREIRA; MÁRCIA N.M. ALVES; LUCIANA MITRAUD; RODRIGO RIBEIRO RESENDE; MARIA JOSÉ CAMPAGNOLE-SANTOS; ROBSON AUGUSTO SOUZA DOS SANTOS; SILVIA GUATIMOSIM. **Beneficial effects of Angiotensin-(1-7) against DOCA-induced diastolic dysfunction occur independently of changes in blood pressure.**Hypertension (Dallas, Tex. 1979).(2015)