

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE MORFOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR

**EFEITOS ANTIARRITMOGÊNICOS DA ANGIOTENSINA-
(1-7) EM UM MODELO DE ARRITMIAS CARDÍACAS *IN*
*VIVO***

Julliane Vasconcelos Joviano dos Santos

Belo Horizonte

2015

Julliane Vasconcelos Joviano dos Santos

**EFEITOS ANTIARRITMOGÊNICOS DA ANGIOTENSINA-
(1-7) EM UM MODELO DE ARRITMIAS CARDÍACAS *IN*
*VIVO***

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais como parte integrante dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Biologia Celular.

Área de concentração: Biologia Celular

Orientador: Prof. Dr. Anderson José Ferreira

Instituto de Ciências Biológicas

Universidade Federal de Minas Gerais

Belo Horizonte

2015

Este trabalho foi realizado nos seguintes laboratórios:

- Laboratório de Biologia Cardíaca do Departamento de Morfologia do Instituto de Ciências Biológicas (ICB) da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG);
- Laboratório de Membranas Excitáveis do Departamento de Bioquímica e Imunologia do ICB-UFMG.

A execução deste trabalho contou com o auxílio financeiro das seguintes Agências de fomento:

- Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES);
- Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq);
- Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG).

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, Prof. Anderson José Ferreira, pela oportunidade de desenvolvimento desse projeto de mestrado e pela acolhida em seu laboratório desde 2010. Agradeço pela confiança depositada em mim desde a minha iniciação científica;

Ao Prof. Jader Cruz pela participação nesse trabalho e toda a equipe do LAMEX, em especial Artur e Humberto, que disponibilizaram tempo para a execução de experimentos e para muitas discussões. Obrigada por todo o aprendizado em eletrofisiologia!

A todos os amigos de laboratório pelo apoio científico e também por todos os momentos de alegrias;

A minha querida família (pai, mãe, Isa e Matheus) e a minha segunda família (Taninha, Rafael e Mariana) pelo amor incondicional e pelo incentivo nas horas mais difíceis;

Ao meu amor, Artur, por ser meu porto seguro, por ser minha inspiração. Agradeço pelo seu esforço e dedicação com esse trabalho. Tenho certeza que sem você nada disso seria possível. Obrigada por seu carinho, por seu cuidado e apoio (pessoal e também científico). Dedico essa dissertação a você!

A todos os meus eternos amigos da graduação pela constante amizade;

A todos os colegas do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular, à Rhuanna e à Prof.^a Cristina Guatimosim, pela dedicação ao curso;

Às Agências de fomento CAPES, FAPEMIG e CNPq, pelo apoio financeiro.

ÍNDICE

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	7
LISTA DE FIGURAS	10
RESUMO	12
ABSTRACT	14
1- INTRODUÇÃO	16
1.1- Fisiologia cardíaca	16
1.1.1 Estrutura geral do coração	16
1.1.2- Acoplamento excitação-contração	17
1.1.3- Condução do impulso cardíaco e arritmias	20
1.2- Sistema Renina-Angiotensina	23
1.3- Angiotensina-(1-7)	24
2- JUSTIFICATIVA	28
3- OBJETIVOS	29
3.1- Objetivo geral	29
3.2- Objetivos específicos	29
4- METODOLOGIA	31
4.1- Animais	31
4.2- Peptídeos e drogas	31
4.3- Procedimentos cirúrgicos	31
4.4- Protocolos experimentais	32
4.5- Isolamento cardiomiócitos ventriculares	34
4.6- Análise da contratilidade	35
4.7- <i>Patch Clamp</i>	36
4.8- Microscopia Confocal	37
4.9- Análise Estatística	38
5- RESULTADOS	39
5.1- Efeitos antiarritmogênicos da Angiotensina-(1-7)	39

5.2- Mecanismos de ação da Angiotensina-(1-7)	41
5.3- Análise de parâmetros hemodinâmicos	49
5.4- Análise das arritmias e da contratilidade de cardiomiócitos isolados	50
5.5- Análise do potencial de ação	54
5.6- Análise do transiente de cálcio	59
6- DISCUSSÃO	63
7- CONCLUSÕES	74
8- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	75

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

°C - graus Celsius

μM - micromolar

μg – microgramas

μL – microlitros

MΩ - mega ohm

A-779 - (D-Ala⁷)-Angiotensina I/II-(1-7)]

Ang I - Angiotensina I

Ang II - Angiotensina II

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

Ang-(1-9) - Angiotensina-(1-9)

AT₁ - Receptor do tipo 1 de Angiotensina II

AT₂ - Receptor do tipo 2 de Angiotensina II

Akt - Proteína quinase B

ANOVA - Análise de variância

BK - bradicinina

bpm - batimentos por minuto

CEBIO - Centro de Bioterismo

CETEA - Comitê de Ética em Experimentação Animal

CIB - *cell isolated buffered*

CPV - contrações prematuras ventriculares

cm - centímetros

DIZE - Aceturato de diminazeno

dL/dt – derivada do comprimento em relação à derivada do tempo

dV/dt - derivada da voltagem em relação à derivada do tempo

ECA - Enzima conversora de Angiotensina

ECA2 - Enzima conversora de Angiotensina 2

ECG - Eletrocardiograma

eNOS - *endotelial nitric oxide synthase* - óxido nítrico sintase endotelial

EPM - Erro padrão da média

F - fluorescência

F0- fluorescência basal

FC - frequência cardíaca

g - gramas

Hz - Hertz

I_{K1} - corrente de potássio retificadora de entrada

I_{to} - corrente de potássio de saída transiente rápida

$I_{Ca,L}$ - corrente de cálcio do tipo L

iNOS - *inducible nitric oxide synthase* - óxido nítrico sintase induzida

i.p. - intraperitoneal

i.v. - intravenoso

KHz - -kilo hertz

L-NAME - *N^G-nitro-L-arginine methyl Ester*

LTTC - *L-type calcium channel* - canal de cálcio tipo L

MS - morte súbita

min - minutos

mL- mililitro

mg - miligrama

mM - milimolar

ms - milisegundo

mmHg - milímetros de mercúrio

n - número de animais

NEP - *neutral endopeptidase* - enzima endopeptidase neutra

nM - nanomolar

nNOS - *neuronal nitric oxide synthase* - óxido nítrico sintase neuronal

NO - *nitric oxide*- óxido nítrico

NSA - nó sinusal

PAM - pressão arterial média

PA - potencial de ação

pA - picoampere

PDP - pós-despolarização precoce
PDT - pós-despolarização tardia
PE10 - tubo de polietileno número 10
PE50 - tubo de polietileno número 50
pg - picograma
PKA - proteína quinase A
PKC - proteína quinase C
PKG - proteína quinase G
PMCA - *plasma membrane calcium ATPase* - Ca^{+2} -ATPase sarcolemal
PEP - *prolylendopeptidase*- prolil-endopeptidase
RPA - repolarização do potencial de ação
RS - retículo sarcoplasmático
RyR - *Ryanodin receptor* - receptor de rianodina
SCQ - sistema caliceína-cinina
SRA - sistema renina-angiotensina
SERCA - *Sarco-Endoplasmic reticulum calcium* - Ca^{+2} -ATPase do retículo sarcoplasmático
TNF- α - *tumor necrose factor* - fator de necrose tumoral
TV - taquicardia ventricular
V- volts

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Estrutura do coração e sentido do fluxo sanguíneo	17
Figura 2: Principais correntes iônicas e canais que geram as fases do PA na célula cardíaca	19
Figura 3: Esquema de um coração mostrando a via de propagação do estímulo elétrico gerado no nó sinusal	21
Figura 4: Esquema de um traçado eletrocardiográfico mostrando	22
Figura 5: Representação esquemática do sistema renina-angiotensina	23
Figura 6: Representação esquemática das vias de formação da Ang-(1-7)	25
Figura 7: Eixos do sistema renina-angiotensina	26
Figura 8: Protocolo experimental para a análise dos efeitos antiarrítmicos da Ang-(1-7)	33
Figura 9: Protocolo experimental para a análise dos mecanismos de ação da Ang-(1-7) ..	34
Figura 10: Registros eletrocardiográficos mostrando os eventos arrítmicos	39
Figura 11: Efeitos da Ang-(1-7) em três concentrações diferentes	40
Figura 12: Eventos arrítmicos antes e depois da injeção de salina	41
Figura 13: Eventos arrítmicos antes e depois da injeção A-779 + Ang-(1-7) + adrenalina	42
Figura 14: Eventos arrítmicos antes e depois da injeção A-779 + adrenalina	43
Figura 15: Eventos arrítmicos antes e depois da injeção de L-NAME + Ang-(1-7) + adrenalina	43
Figura 16: Eventos arrítmicos antes e depois da injeção L-NAME + adrenalina	44
Figura 17: Eventos arrítmicos antes e depois da injeção de DIZE	45

Figura 18: Eventos arrítmicos antes e depois da injeção de DIZE + A-779 + adrenalina	45
Figura 19: Eventos arrítmicos antes e depois da injeção de A-779 + 1min + DIZE + adrenalina	47
Figura 20: Eventos arrítmicos antes e depois da injeção de L-NAME + DIZE + adrenalina	48
Figura 21: Comparação da quantidade de eventos arrítmicos entre todos os grupos controles	49
Figura 22: Efeitos da adrenalina associada ou não a Ang-(1-7) na pressão arterial média e na frequência cardíaca	50
Figura 23: Quantificação das arritmias a partir da técnica de contratilidade celular	51
Figura 24: Representação do traçado de contratilidade	51
Figura 25: Fração de encurtamento dos cardiomiócitos	51
Figura 26: Taxa máxima de contração e relaxamento	53
Figura 27: Tempo para atingir o pico máximo de contração (<i>time-to-peak</i>) e tempo para atingir 50% de relaxamento	54
Figura 28: Figura representativa dos traçados do potencial de ação	55
Figura 29: Tempo para repolarização do potencial de ação	56
Figura 30: Potencial de repouso	57
Figura 31: Amplitude do potencial de ação.....	58
Figura 32: Despolarização máxima do PA (dV/dt)	59
Figura 33: Efeitos da Ang-(1-7) e do DIZE na quantidade de <i>waves</i> de cálcio	60
Figura 34: Efeitos da Ang-(1-7) e do DIZE no manejo de cálcio	62

RESUMO

O sistema renina-angiotensina é importante na regulação cardiovascular e na geração e condução do impulso cardíaco. Estudos já demonstraram que a Angiotensina (Ang)-(1-7) possui efeitos antiarrítmicos e cardioprotetores em corações isolados de ratos. Contudo, os efeitos da Ang-(1-7) nas arritmias cardíacas *in vivo* ainda não foram avaliados. Sendo assim, o objetivo desse projeto foi investigar o efeito antiarrítmico da Ang-(1-7) *in vivo* e seus mecanismos de ação. Para isso, arritmias foram induzidas em ratos com uma combinação de halotano (1,5%) e adrenalina (5 a 20 µg/kg; via veia jugular). Eletrodos foram posicionados para registros eletrocardiográficos. O protocolo experimental foi composto por 10 min de registro das arritmias desencadeadas pela adrenalina, seguidos de mais 10 min de registro das arritmias causadas por nova injeção de adrenalina associada a Ang-(1-7) (0,04; 4 ou 400 nM). Para avaliação dos mecanismos de ação foi utilizado A-779, antagonista do receptor da Ang-(1-7), L-NAME, inibidor inespecífico das óxido nítrico (NO) sintases, e o DIZE, ativador da ECA2 [principal enzima formadora de Ang-(1-7)]. Parâmetros hemodinâmicos (pressão arterial e frequência cardíaca) foram analisados a partir de uma cânula inserida na artéria femoral. Nossos resultados indicaram que a Ang-(1-7) (4 nM) reduz significativamente a quantidade de arritmias quando comparado ao controle [49±13 eventos arrítmicos vs. 16±4 eventos arrítmicos na presença da Ang-(1-7)]. Esse efeito foi bloqueado pelo A-779, pelo L-NAME e não provocou alterações nos parâmetros hemodinâmicos. A injeção do DIZE também promoveu uma redução significativa das arritmias. A fim de confirmar os efeitos antiarrítmicos *in vivo* da Ang-(1-7), bem como analisar esses efeitos a nível celular, cardiomiócitos ventriculares de camundongos foram isolados e utilizados em três técnicas experimentais (análise da contratilidade, *patch clamp* e microscopia confocal). Uma solução de halotano+isoproterenol foi administrada nos cardiomiócitos com o objetivo de desencadear as arritmias. Nos experimentos de contratilidade foi confirmado que a Ang-(1-7) e o DIZE diminuem significativamente a quantidade de arritmias sem alterar a força de contração. Para avaliar se a redução das arritmias está relacionada com alterações na excitabilidade dos cardiomiócitos, nós analisamos o potencial de ação dessas células. Os resultados mostraram um encurtamento do potencial de ação e diminuição do potencial de repouso dos cardiomiócitos tratados com Ang-(1-7) ou DIZE, o que pode ser considerado um efeito cardioprotetor. Por fim, analisamos a participação do cálcio nesses

efeitos utilizando a técnica de confocal e observamos que a Ang-(1-7) e o DIZE diminuem a quantidade de *waves*. Não houve alteração significativa na amplitude do transiente de cálcio mas, considerando o decaimento do transiente, foi observada uma redução significativa desse parâmetro no grupo de células incubadas apenas com a Ang-(1-7). Assim, concluímos que a Ang-(1-7) reduz as arritmias *in vivo* via Mas e liberação de NO. Esse efeito foi confirmado pela administração do DIZE que também apresentou efeito antiarrítmico. Estes dados sugerem que a Ang-(1-7) e o DIZE podem ser úteis para o tratamento de síndromes arritmogênicas que levam à morte súbita.

Palavras-chave: Arritmias cardíacas, Morte súbita, Sistema renina-angiotensina, Enzima-conversora de angiotensina 2, correntes iônicas.

ABSTRACT

Angiotensin (Ang)-(1-7), a peptide of the renin-angiotensin system, has cardioprotective and antiarrhythmic effects in isolated rat hearts. However, the effects of this peptide on cardiac arrhythmias *in vivo* and details regarding its mechanisms of action are unknown. The aim of this study was to investigate the effects of Ang-(1-7) on cardiac arrhythmias *in vivo* and its mechanisms of action. Cardiac arrhythmias were induced in Wistar rats using a combination of halothane (1.5%) and epinephrine (5 to 20 μ g/kg, iv). Electrocardiographic records were made by placing an electrode in each rat limb. A 10-minute period of arrhythmias was followed by an additional 10-minute period of arrhythmias in the presence Ang-(1-7). To analyze the mechanisms of action, we used A-779 [antagonist of Ang-(1-7) receptor], L-NAME (inhibitor of nitric oxide synthases) and DIZE [activator of the ACE2, the main Ang-(1-7)-forming enzyme]. Blood pressure and heart rate were evaluated by a cannula inserted into the femoral artery. Our data showed that Ang-(1-7) significantly reduced cardiac arrhythmias when compared with control [Control: 49 \pm 13 and Ang-(1-7): 16 \pm 4 arrhythmic events]. This effect was blocked by A-779 and L-NAME, without changes in the hemodynamic parameters. DIZE injection also promoted a significant reduction in the arrhythmic events. To confirm these *in vivo* antiarrhythmic effects of Ang-(1-7), ventricular cardiomyocytes were isolated from mice and used in three experimental techniques (analysis of contractility, patch clamp and confocal microscopy). Cardiomyocytes were perfused with a solution of halothane plus isoproterenol in order to trigger arrhythmias. Contractility experiments confirmed that Ang-(1-7) and DIZE significantly decrease the amount of arrhythmias without changing the contraction force. To evaluate if this reduction in arrhythmias was associated to alterations in the excitability of cardiomyocytes, we analyzed the action potential. The results showed a shortening of the action potential and a decrease in the resting potential of cardiomyocytes treated with Ang-(1-7) and DIZE. These actions can be considered as cardioprotective effects. Finally, we analyzed the involvement of calcium in these effects using confocal microscopy and it was observed that Ang-(1-7) and DIZE decreased the amount of calcium waves. There were no significant changes in the amplitude of the calcium transient, but considering the transient decay, we observed a significant reduction in this parameter only in cells incubated with Ang-(1-7). Altogether, these results indicate that Ang-(1-7) reduces cardiac arrhythmias *in vivo* through activation of Mas and nitric

oxide release. This effect was confirmed by DIZE. These data suggest that Ang-(1-7) and DIZE might be a feasible therapeutic agent to treat arrhythmogenic syndromes.

Key words: Cardiac arrhythmias, Sudden death, Renin-angiotensin system, Angiotensin-converting enzyme 2, ionic currents.

1- INTRODUÇÃO

1.1- *Fisiologia cardíaca*

1.1.1- Estrutura geral do coração

O coração exibe um conjunto amplo de atividades e capacidade funcional executando uma enorme quantidade de trabalho durante a vida de um indivíduo (Berne & Levy, 2009). Nos mamíferos, o coração encontra-se organizado em quatro cavidades, dois átrios (cavidades superiores direita e esquerda) e dois ventrículos (cavidades inferiores direita e esquerda) (**Figura 1**). Por essas cavidades circula o sangue sendo que, o átrio direito recebe sangue não oxigenado através das veias cavas e o átrio esquerdo recebe sangue recém-oxigenado pelos pulmões através das veias pulmonares. O sangue é ejetado do coração pelas artérias pulmonar e aorta que saem dos ventrículos direito e esquerdo, respectivamente. O ventrículo direito atua como uma “bomba de volume”, desenvolvendo pressões relativamente baixas ao ejetar sangue venoso (rico em gás carbônico) para circulação pulmonar e o ventrículo esquerdo ejeta o sangue com alta pressão para a circulação sistêmica. Esse sangue é arterial (rico em oxigênio) e nutre todos os sistemas do organismo, incluindo o próprio coração (nutrido através das artérias coronárias). É importante ressaltar que nessas cavidades não ocorre qualquer tipo de mistura entre sangue arterial e venoso, ou seja, não existe nenhum tipo de comunicação direta entre os átrios ou entre os ventrículos. Por outro lado, a comunicação átrio-ventrículo é feita através das valvas cardíacas, sendo que a tricúspide comunica o átrio e ventrículo direitos e a mitral, átrio e ventrículo esquerdos. A arquitetura dessas estruturas permite a passagem de sangue em um único sentido (do átrio para o ventrículo), o que confere grande vantagem adaptativa, pois impede o refluxo sanguíneo para os átrios durante a contração ventricular (Guyton & Hall, 2006).

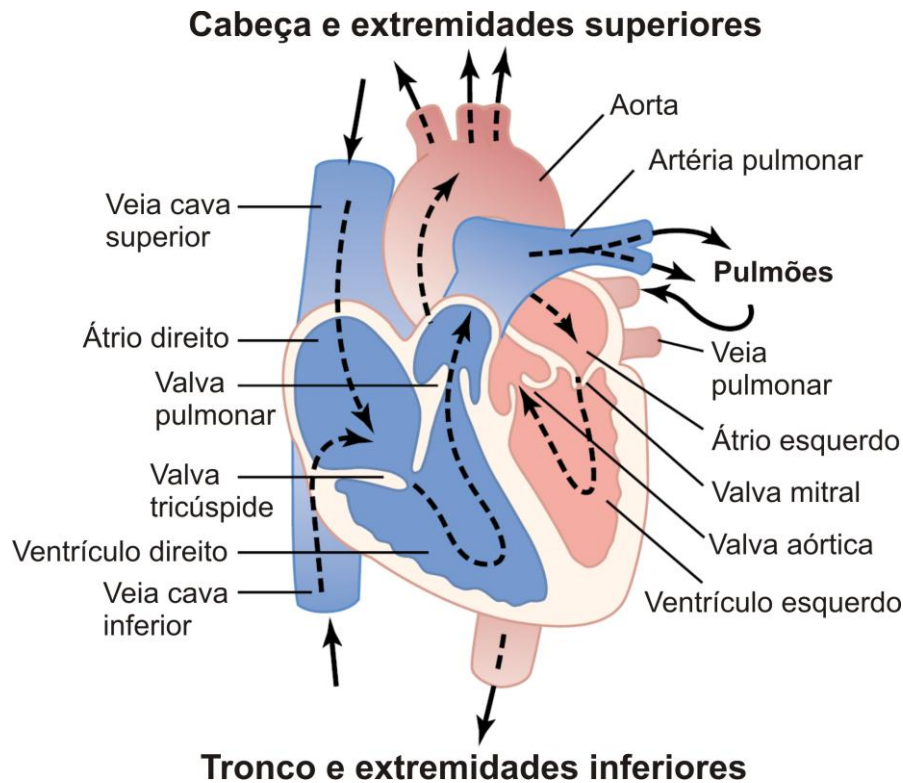


Figura 1: Estrutura do coração e sentido do fluxo sanguíneo através das câmaras e valvas cardíacas. (Modificado de Guyton & Hall, 2006).

Já se sabe que o coração é um órgão mecânico e também elétrico. Seu músculo (músculo estriado cardíaco) apresenta uma estrutura bem diferenciada quando comparado com outros tecidos excitáveis, sendo que o músculo cardíaco é constituído por células que estão intimamente acopladas entre si, o que permite que o órgão funcione como um sincício (Van Breemen, 1953; Conde-Garcia, 1998). As células do coração estão conectadas por membranas juncionais dotadas de regiões especializadas, tanto para a fixação mecânica e manutenção da integridade estrutural do tecido cardíaco, como para a transmissão de corrente elétrica (Sjöstrand et al, 1958). O processo que sincroniza a ativação elétrica à atividade mecânica nas células musculares cardíacas é chamado de acoplamento excitação-contração.

1.1.2- Acoplamento excitação-contração

O coração de uma pessoa bate em média cerca de cem mil vezes por dia, durante todos os dias de sua vida. Para tanto, é preciso um mecanismo que mantenha a

periodicidade e estabilidade dos batimentos cardíacos. A cada ciclo cardíaco é preciso um estímulo elétrico que seja capaz de gerar um potencial de ação (PA) e, conseqüentemente, um evento de despolarização celular de maneira cíclica e periódica. Há muito tempo já se sabe que existe uma correlação entre a excitabilidade elétrica e a contração muscular cardíaca (o que é chamado de acoplamento excitação-contração) (Fabiato & Fabiato, 1972; Bers, 2001). A transmissão dos impulsos elétricos é feita célula a célula, por meio das junções comunicantes, e desse processo participam íons importantes como Na^+ , K^+ e Ca^{+2} . Geralmente, para que a contração ocorra no cardiomiócito, é necessário que a membrana celular gere e propague um PA, que é uma variação rápida e intensa do potencial elétrico encontrado na membrana das células excitáveis.

De acordo com Nerbonne & Kass (2005), o PA cardíaco pode ser dividido em 4 fases. A **Figura 2** resume essas fases e a participação relativa das diferentes correntes iônicas em cada uma delas. A fase 0 constitui a despolarização da célula cardíaca, caracterizada pela ativação dos canais rápidos para sódio permitindo o influxo de Na^+ no citoplasma. Na fase 1 observa-se o início da repolarização da célula cardíaca (repolarização parcial precoce) em função da abertura de canais para potássio de transientes rápidos que conduzem K^+ (Ito) para o meio extracelular. Ainda nessa fase acontece a ativação dos canais para cálcio, principalmente o canal que determina a corrente do tipo L, $\text{I}_{\text{Ca,L}}$. Iniciando a fase 2, após a ativação da $\text{I}_{\text{Ca,L}}$ e conseqüente influxo de Ca^{+2} , ocorre um atraso no processo de repolarização celular, caracterizando a fase de platô. O platô representa um equilíbrio entre a entrada de Ca^{+2} através dos canais de membrana para esse íon e o efluxo de K^+ através de vários tipos de canais de potássio. É importante ressaltar que os canais de cálcio estão concentrados nas projeções de membrana que formam o sistema de túbulos T, que está localizado próximo a um segundo sistema de membranas intracelular que forma o retículo sarcoplasmático (RS). A proximidade entre esses dois sistemas é fundamental no acoplamento excitação-contração, uma vez que o cálcio proveniente dos canais da membrana plasmática ativam os receptores de rianodina (RyR) presentes na membrana do RS. A ativação desses receptores leva à abertura de canais no RS, o que desencadeia a liberação dos estoques de cálcio que estão armazenados nessa organela, elevando de maneira muito rápida a concentração intracelular desse íon e viabilizando seu envolvimento na contratilidade celular. Esse mecanismo explica como estímulos elétricos estão associados aos

mecanismos contráteis inerentes às células cardíacas, garantindo um rápido acesso do cálcio à essa maquinaria. No final da fase 2 acontece ativação dos canais de potássio aliada à inativação da corrente de cálcio. A fase 3 é marcada pela repolarização final da célula cardíaca. Nesse ponto, a corrente de potássio retificadora de entrada (I_{K1}) possui papel importante, pois é ativada pela hiperpolarização da membrana e mantém o potencial de repouso da célula numa faixa restrita, entre -80 e -90 mV. A restituição do potencial de repouso do cardiomiócito caracteriza a fase 4 (Nerbonne & Kass, 2005; Berne & Levy, 2009).

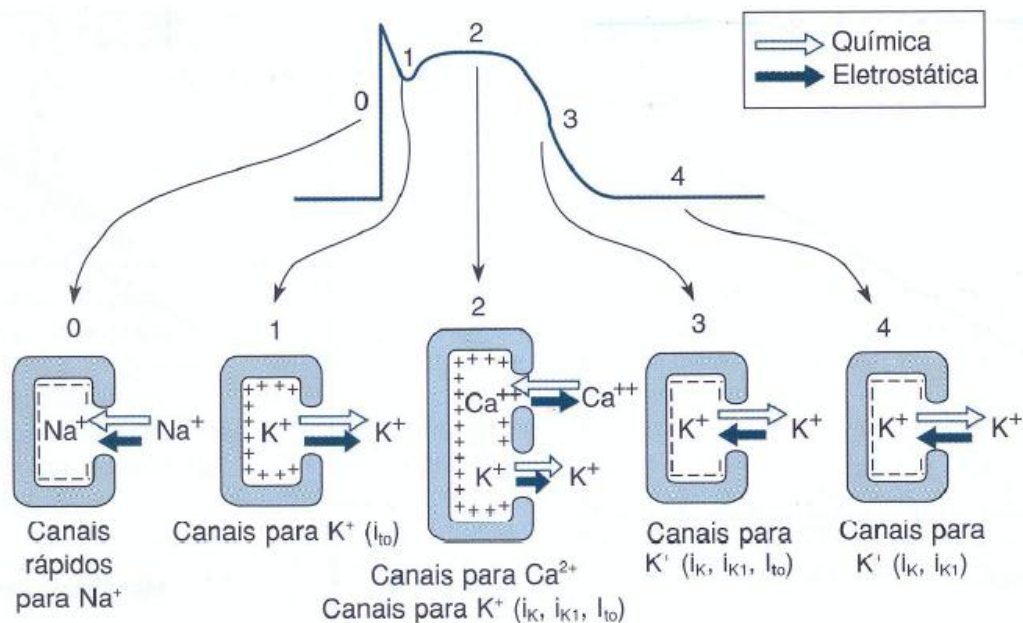


Figura 2: Principais correntes iônicas e canais que geram as fases do PA na célula cardíaca. Fase 0: As forças químicas e eletrostáticas favorecem a entrada de Na^+ gerando a despolarização. Fase 1: As forças químicas e eletrostáticas favorecem o efluxo de K^+ gerando uma repolarização parcial precoce. Fase 2: Fase de platô onde o influxo de Ca^{+2} é balanceado pelo efluxo de K^+ . Fase 3: As forças químicas que favorecem a saída de K^+ predominam sobre as forças eletrostáticas que favorecem a sua entrada. Fase 4: As forças químicas que favorecem a saída de K^+ excedem um pouco as forças eletrostáticas que favorecem o influxo desse íon levando à restituição da fase de repouso. (Modificado de Berne & Levy, 2009).

1.1.3- Condução do impulso cardíaco e arritmias

A morte súbita (MS) é considerada um grande problema de saúde pública mundial sendo ocasionada por uma parada inesperada do sistema circulatório devido à presença de disfunções cardiovasculares e cardiopatias (Chekaki, 2013). A MS pode ser definida como uma morte repentina por causas cardíacas ocorrendo no prazo de uma hora desde o início dos sintomas (Kong et al, 2011). Além dos fatores desencadeadores (isquemia aguda, atividade física, estresse mental e desequilíbrios eletrolíticos) somados a um substrato apropriado (hipertrofia, isquemia do miocárdio e canalopatias), as síndromes arritmogênicas podem aumentar o risco de taquicardias ventriculares que levam à MS (Stengl, 2010).

As arritmias são caracterizadas como mudanças no ritmo, regularidade, origem e condução do impulso cardíaco (Thaler, 2010). No coração os estímulos elétricos são gerados no átrio direito pelas células do nó sinusal (NSA) capazes de desencadear um PA e, conseqüentemente, um evento de despolarização celular. As células do NSA participam do controle da atividade rítmica do coração, pois a cada estímulo elétrico gerado pelo NSA ocorre uma onda de contração no coração. O impulso é então passado por vias internodais até o nó átrio ventricular. Após um pequeno atraso, esse estímulo é conduzido pelo feixe de His, localizado no septo interventricular, para as fibras de Purkinje e endocárdio do ápice, de onde será transmitido para o miocárdio ventricular (**Figura 3**) (Machado 2012).

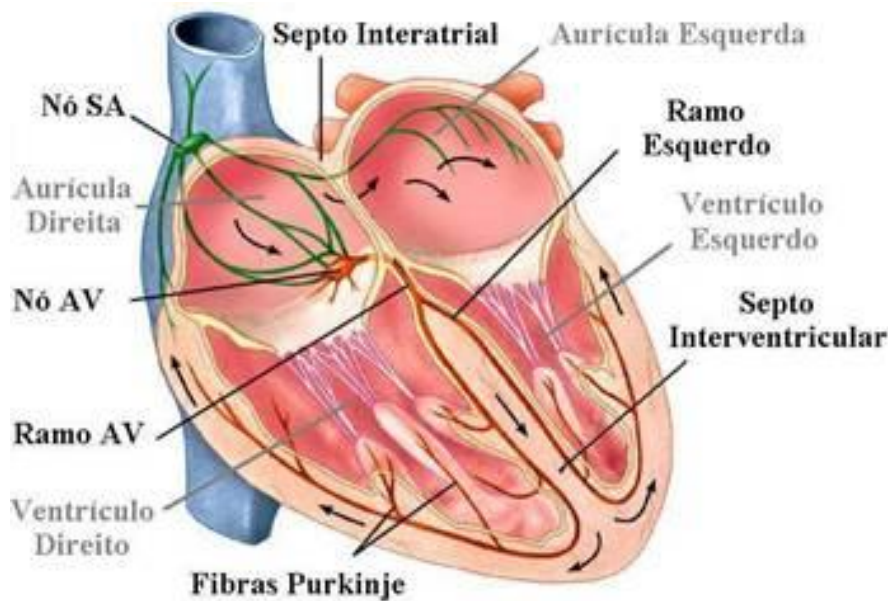


Figura 3: Esquema de um coração mostrando a via de propagação do estímulo elétrico gerado no nó sinusal (Machado 2012). AV: átrioventricular; SA: sinusal.

O estabelecimento do percurso do estímulo que precisa ocorrer de maneira ordenada e específica e do tempo de sua duração (em média 0,19 s) é de fundamental importância para que ocorra a contração sincronizada de toda a musculatura cardíaca. Qualquer alteração na geração e/ou propagação desse impulso elétrico pode levar às arritmias cardíacas que podem ser visualizadas em determinados equipamentos como, por exemplo, no eletrocardiograma (ECG). O ECG fornece uma representação gráfica dos processos de despolarização e repolarização das células do miocárdio proporcionando informações importantes sobre a frequência e ritmo cardíacos (**Figura 4**). Um traçado eletrocardiográfico clássico contém as ondas P, T e o complexo QRS. A onda P é constituída pela soma das despolarizações atriais. O complexo QRS é formado por três ondas distintas: Q, R e S. A formação desse complexo deve-se aos potenciais gerados quando os ventrículos se despolarizam, enquanto que a onda T representa a repolarização ventricular.

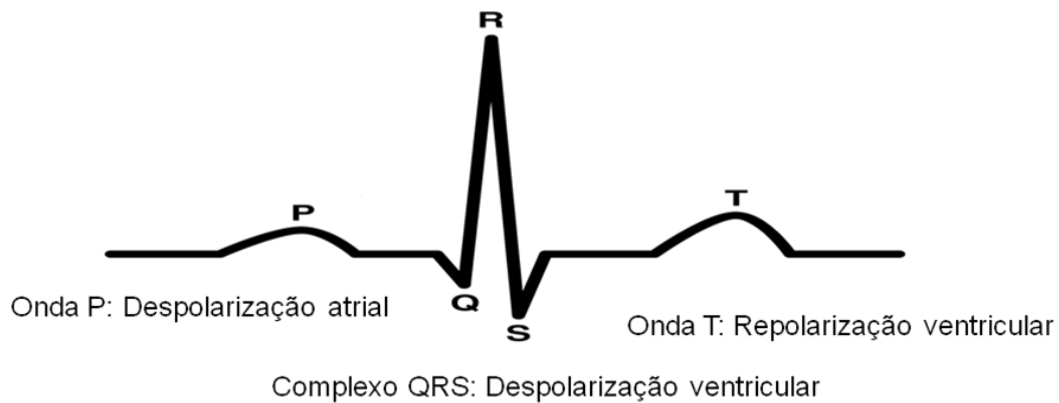


Figura 4: Esquema de um traçado eletrocardiográfico mostrando os processos de despolarização e repolarização das células do miocárdio.

As causas que podem originar arritmias cardíacas incluem: hipoxia e isquemia do miocárdio devido a desordens pulmonares ou embolia; irritabilidade como miocardites; estimulação simpática desencadeada por hipertireoidismo, insuficiência cardíaca congestiva e stress emocional; uso de drogas e fármacos; alterações iônicas de cálcio e magnésio; bradicardias; e hipertrofia atrial e ventricular (Thaler, 2010). Ainda podemos destacar outras situações que desencadeiam arritmias como: 1) um aumento na excitabilidade da membrana celular, levando ao surgimento de taquicardias induzidas por ganho de automaticidade ou “atividade de gatilho”; 2) um defeito na formação do impulso elétrico no NSA, o que geralmente causa bradicardia sinoatrial, pausa sinoatrial ou síndrome bradi-taquicárdica e 3) uma redução na condução normal célula-célula levando, com isso, a um bloqueio do sistema de condução cardíaco ou a uma redução da propagação do sinal elétrico em determinadas regiões do miocárdio (Rokita & Anderson, 2012). Apesar de avanços no diagnóstico e no tratamento dos diversos tipos de arritmias cardíacas, o custo para o tratamento e o número de mortes causadas por essas disfunções continuam elevados tanto em países desenvolvidos, quanto naqueles em desenvolvimento. Segundo dados do Ministério da Saúde, cerca de 5% da população brasileira sofre com algum tipo de arritmia. Isolada, ela pode não representar riscos graves, mas sem acompanhamento médico o problema pode se agravar e causar MS.

1.2- Sistema Renina-Angiotensina

O sistema renina-angiotensina (SRA) é bem mais reconhecido por suas ações sistêmicas, como regulação da pressão arterial, volume sanguíneo e natriurese (Tikellis et al, 2012). Classicamente, esse sistema é definido como uma cascata enzimática onde a renina, uma aspartil-protease, hidrolisa o angiotensinogênio produzido pelo fígado, formando o decapeptídeo biologicamente inativo Angiotensina I (Ang I) que apresenta a seguinte cadeia de aminoácidos: Asp¹-Arg²-Val³-Tyr⁴-Ile⁵-His⁶-Pro⁷-Phe⁸-His⁹-Leu¹⁰. Através da enzima conversora de angiotensina (ECA), a Ang I é convertida no octapeptídeo Angiotensina II (Ang II) composta por Asp¹-Arg²-Val³-Tyr⁴-Ile⁵-His⁶-Pro⁷-Phe⁸ (Page & Helmer, 1940; Skeggs et al, 1956) (**Figura 5**).

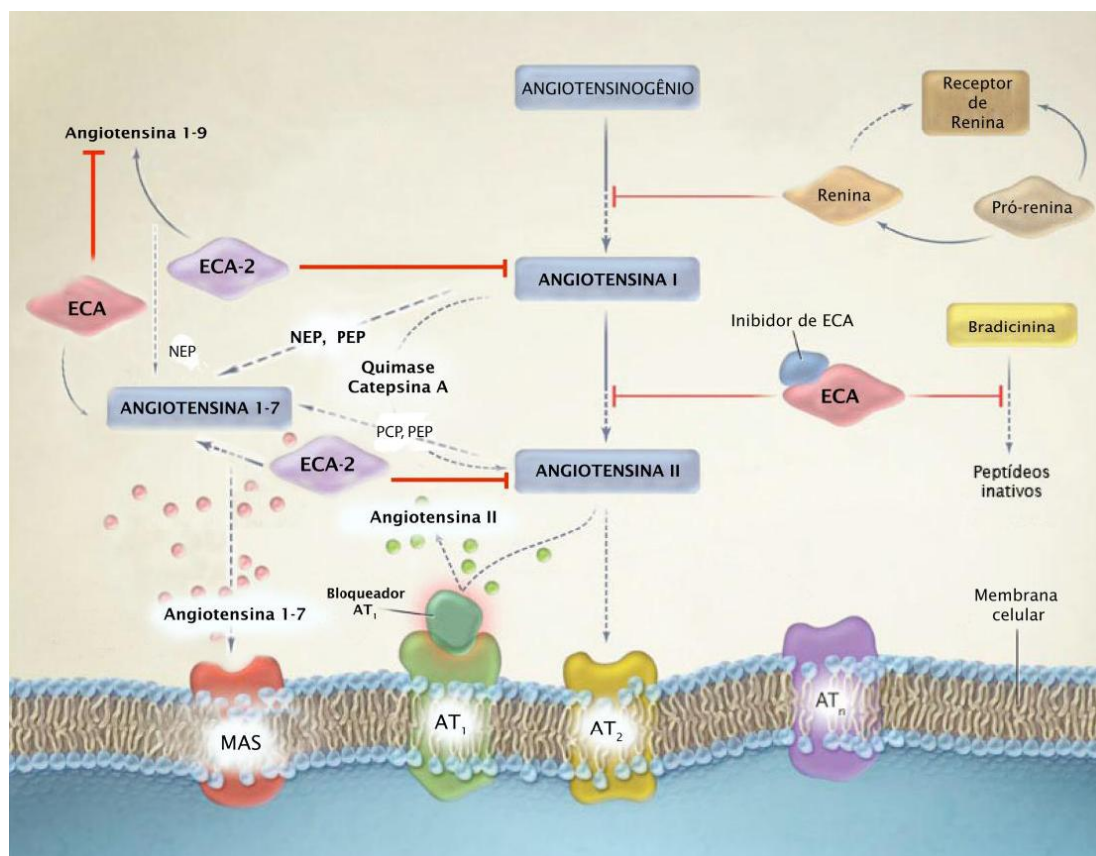


Figura 5: Representação esquemática do sistema renina-angiotensina (SRA). ECA, enzima conversora de angiotensina; ECA2, enzima conversora de angiotensina 2; AT₁, receptor tipo 1 de Ang II; AT₂, receptor tipo 2 de Ang II; AT_n, outros receptores para angiotensina; Mas, receptor de Ang-(1-7); NEP, endopeptidase neutra; PEP, prolil-endopeptidase; PCP, prolil-carboxipeptidase. (Modificado de Ferreira & Santos, 2005).

Sabe-se que a Ang II está relacionada com a promoção do aumento da pressão arterial por induzir vasoconstrição periférica, além de promover o aumento do volume sanguíneo ao estimular o sistema nervoso simpático. Além disso, ela participa da produção e liberação de aldosterona que promove aumento da sede e retenção de sódio, influenciando a pressão arterial sistêmica (Thomas et al, 2008). A Ang II age em receptores acoplados a proteína G com sete domínios transmembrana, denominados AT₁ e AT₂. A maioria das ações da Ang II é mediada via receptor AT₁ (Steckelings et al, 2005). Por exemplo, no coração a Ang II ligada ao receptor AT₁ pode causar mudanças no influxo de cálcio intracelular e mudanças na fase de platô do PA cardíaco (Dempsey et al, 1971; Hoffmann et al, 2001). Além da Ang II, a Angiotensina-(1-7) [Ang-(1-7)] também merece destaque dentre os componentes do SRA.

1.3- Angiotensina-(1-7)

A Ang-(1-7) (Asp¹-Arg²-Val³-Tyr⁴-Ile⁵-His⁶-Pro⁷) é formada principalmente por meio de uma enzima homóloga à ECA, a enzima conversora de angiotensina 2 (ECA2), que apresenta alta afinidade pela Ang II (Ortiz-Pérez et al, 2013). Além dessa via, a hidrólise da Ang I pela endopeptidase neutra (NEP) ou prolil-endopeptidase (PEP) pode formar a Ang-(1-7) diretamente, apesar dessa via não ser muito eficiente sob os pontos de vista fisiológico e catalítico (Dilauro & Burms, 2009; Ferreira & Santos, 2005; Santos et al, 2008; Santos et al, 2003). Ang I também pode ser clivada em Ang-(1-9) e, posteriormente, em Ang-(1-7) pela ECA ou pela PEP (**Figura 6**).

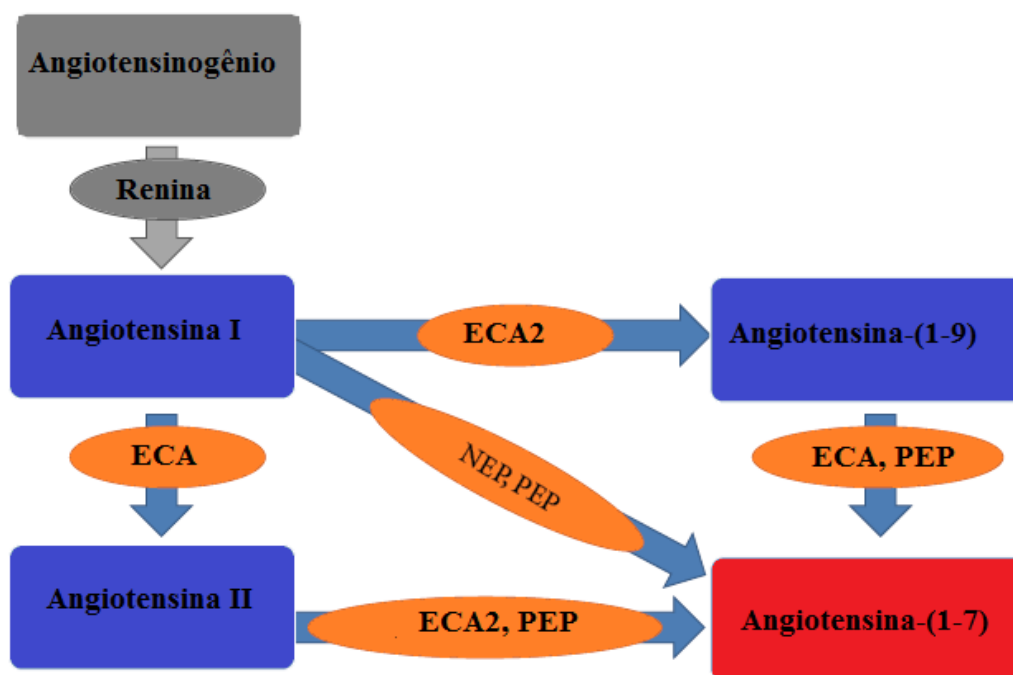


Figura 6: Representação esquemática das vias de formação da Ang-(1-7). ECA, enzima conversora de angiotensina; ECA2, enzima conversora de angiotensina 2; NEP, endopeptidase neutra; PEP, prolil-endopeptidase. (Modificado de Gomes et al, 2012).

A partir de evidências farmacológicas obtidas com o A-779, um antagonista seletivo da Ang-(1-7), foi identificado um receptor específico para esse peptídeo, denominado receptor Mas que, como os receptores AT₁ e AT₂ da Ang II, também apresenta domínio transmembrana e é ligado à proteína G (Santos et al, 2003). Em condições fisiológicas, a concentração de Ang-(1-7) no plasma sanguíneo é da ordem de picomolar (Joyner et al, 2007; Pendergrass et al, 2008) e a manutenção dessa concentração é muito importante para a homeostase de todo o sistema cardiovascular (Ferrario, 2010).

A Ang-(1-7) possui diversos efeitos contra regulatórios aos da Ang II. Por exemplo, ela apresenta atividade vasodilatadora, aumento do fluxo urinário e da excreção de sódio, redução do volume sanguíneo, além de ser antioxidante, antitrombótica e antiproliferativa (Handa et al, 1996; Kucharewicz et al, 2002; Tallant e Clark, 2003; Sampaio et al, 2007a; Fraga-Silva et al, 2011; Mordwinkin et al, 2012). A interação da

Ang-(1-7) com o Mas resulta também em efeitos anti-hipertensivos (Ferrario et al, 1998), melhora da função endotelial (Faria-Silva et al, 2005) e estímulo da liberação de bradicinina (Brosnihan et al, 1996). Atualmente, o SRA vem sendo considerado uma cascata enzimática cada vez mais complexa, destacando-se dois eixos, ou seja, o eixo clássico composto pela ECA, Ang II e receptor AT₁ (com atividades inflamatórias, proliferativas e fibróticas) e um segundo eixo formado pela ECA2, Ang-(1-7) e Mas (com atividades que modulam o eixo clássico) (Herath et al, 2013) (**Figura 7**).

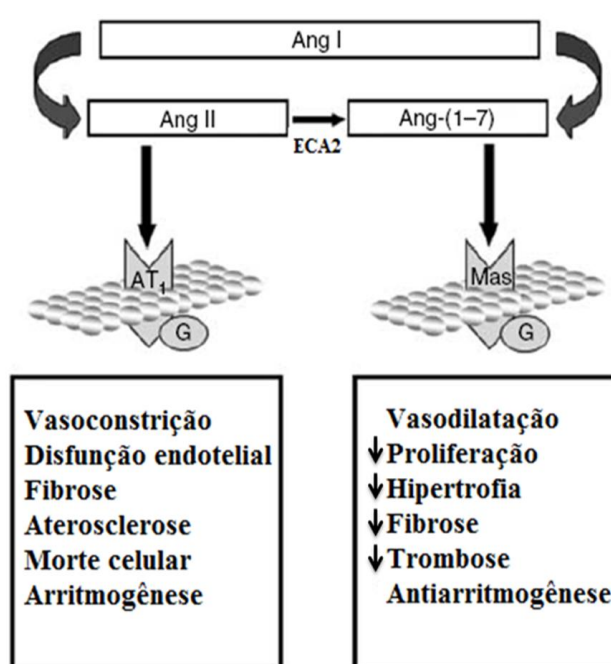


Figura 7: Eixos do sistema renina-angiotensina. Ang I: Angiotensina I; Ang II: Angiotensina II; Ang-(1-7): Angiotensina-(1-7); ECA2: enzima conversora de angiotensina 2; AT₁: receptor tipo 1 da Ang II; Mas: receptor da Ang-(1-7); G: proteína G. (Modificado de Santos et al, 2003).

A presença de componentes do SRA em tecidos específicos (por exemplo, coração, cérebro e rins) sugere a existência de SRA locais (Flores-Munoz et al, 2012). No coração, o SRA apresenta papel crucial na regulação cardiovascular, sendo importante na geração e condução do impulso cardíaco. Já foi descrito que a Ang-(1-7) é capaz de

prevenir taquiarritmias e fibrilações ventriculares e atriais em corações isolados de ratos e cães (Ferreira et al, 2001; Liu et al, 2011), aumentar o débito cardíaco, melhorar a perfusão coronariana e reduzir áreas de infarto, hipertrofia e fibrose (Loot et al, 2002; Sampaio et al, 2003; Marques et al, 2011; Flores-Munoz et al, 2012). Estudos também mostraram que camundongos deficientes para o Mas apresentam disfunção cardíaca evidenciada pela diminuição da tensão sistólica (tensão de contração do coração), diminuição da velocidade de contração e relaxamento do miocárdio, além da redução da pressão no ventrículo esquerdo e da frequência cardíaca (Gembardt et al, 2003; Castro et al, 2006). Como mencionado anteriormente, a Ang-(1-7) é capaz de melhorar a função contrátil e reduzir a duração e a severidade de arritmias cardíacas durante períodos de isquemia/reperfusão em modelos de coração isolado de ratos (Ferreira et al, 2001; Santos et al, 2004). No entanto, o efeito antiarrítmico da Ang-(1-7) em modelos *in vivo*, bem como os mecanismos envolvidos nessa ação, ainda não foram totalmente analisados.

O coração é um importante alvo da Ang-(1-7) onde exerce seus efeitos diretamente nos cardiomiócitos (Gomes et al, 2012). Alguns trabalhos já demonstraram a expressão da Ang-(1-7) em cardiomiócitos de ratos e em células do NSA, fornecendo, assim, um suporte morfológico para os possíveis efeitos antiarritmogênicos desse peptídeo (Ferreira et al, 2012). Além disso, as expressões da ECA e ECA2 também foram observadas em cardiomiócitos e em células endoteliais (Kohlstedt et al, 2013), assim como a presença dos receptores da Ang II (AT₁ e AT₂) e do Mas (Burrel et al, 2005; Santos et al, 2006; Alenina et al, 2008). As drogas antiarritmogênicas são importantes para a manutenção do ritmo sinusal e para a prevenção de eventos de fibrilação atrial e/ou ventricular que podem levar à MS. Ainda não existe uma droga antiarrítmica ideal devido aos diversos tipos de arritmias (por exemplo, arritmias de origem sinusal, foco ectópico, arritmias de reentrância e arritmias ventriculares e/ou atriais sustentadas ou não) (Thaler, 2010). Sendo assim, os vários tipos de arritmias podem exigir diferentes tipos de drogas, com efeito no PA cardíaco ou em canais iônicos de Na⁺, K⁺ ou Ca²⁺ para seu tratamento (Hashimoto, 2007). As alterações nas correntes de cálcio, por exemplo, estão muito relacionadas com a insuficiência cardíaca e desenvolvimento de arritmias (Gomes et al, 2010).

2- JUSTIFICATIVA

A ação cardioprotetora da Ang-(1-7) tem sido cada vez mais reconhecida. A avaliação dos possíveis efeitos antiarritmogênicos *in vivo* da Ang-(1-7), dos mecanismos de ação envolvidos nesse efeito e de sua interferência em canais e correntes iônicas de cardiomiócitos são de fundamental importância para o desenvolvimento de novos agentes terapêuticos que possam ser utilizados durante síndromes arritmogênicas que podem levar à MS. A Ang-(1-7) pode ser vista como uma alternativa às drogas antiarrítmicas já utilizadas na clínica com a vantagem de ser um peptídeo endógeno do organismo.

3- OBJETIVOS

3.1- *Objetivo geral*

Avaliar a atividade antiarritmogênica *in vivo* da Ang-(1-7), bem como investigar os mecanismos de ação envolvidos nesse efeito.

3.2- *Objetivos específicos*

- Verificar a ação antiarritmogênica da Ang-(1-7) (0,04 nM; 4 nM e 400 nM) utilizando um modelo *in vivo* a partir de registros eletrocardiográficos;
- Verificar o papel do receptor Mas nos efeitos antiarritmogênicos *in vivo* da Ang-(1-7) a partir de registros eletrocardiográficos;
- Verificar o papel do óxido nítrico nos efeitos antiarritmogênicos *in vivo* da Ang-(1-7) a partir de registros eletrocardiográficos;
- Confirmar os efeitos antiarritmogênicos *in vivo* da Ang-(1-7) utilizando o composto aceturato de diminazeno (DIZE) (ativador da ECA2) a partir de registros eletrocardiográficos;
- Verificar o papel do receptor Mas nos efeitos antiarritmogênicos *in vivo* do DIZE a partir de registros eletrocardiográficos;
- Verificar o papel do óxido nítrico nos efeitos antiarritmogênicos *in vivo* do DIZE a partir de registros eletrocardiográficos;
- Avaliar os efeitos da injeção *in vivo* da Ang-(1-7) em parâmetros hemodinâmicos: pressão arterial média (PAM) e frequência cardíaca (FC);
- Avaliar os efeitos da Ang-(1-7) e do DIZE na contratilidade de cardiomiócitos ventriculares isolados em um modelo de arritmia;
- Investigar os efeitos da administração da Ang-(1-7) e do DIZE nas variáveis do PA (amplitude, duração e potencial de repouso) em cardiomiócitos ventriculares

isolados em um modelo de arritmia utilizando a técnica de *whole-cell patch clamp*;

- Avaliar a influência da administração da Ang-(1-7) e do DIZE sobre o desencadeamento das ondas de cálcio (*waves*) em cardiomiócitos ventriculares isolados em um modelo de arritmia utilizando a técnica de microscopia confocal;
- Avaliar os efeitos da administração da Ang-(1-7) e do DIZE no transiente de cálcio de cardiomiócitos ventriculares isolados em um modelo de arritmia utilizando a técnica de microscopia confocal.

4- METODOLOGIA

4.1- *Animais*

Foram utilizados ratos Wistar machos com peso corporal entre 200 e 300g provenientes do Centro de Bioterismo (CEBIO) do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG). Para os experimentos de eletrofisiologia cardíaca e microscopia confocal foram utilizados camundongos *Black C57* machos com peso corporal entre 20 e 30g também provenientes do CEBIO. Os animais tiveram livre acesso à água e ração e foram acondicionados em biotério apropriado com controle de temperatura e luminosidade (7-19 h). Este projeto foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal (CETEA-UFMG) sob o protocolo nº 3/2014.

4.2- *Peptídeos e drogas*

A Ang-(1-7) foi diluída em solução de salina estéril. Uma curva dose-resposta para a Ang-(1-7) foi realizada com as concentrações de 0,04 nM; 4 nM e 400 nM, sendo que a concentração em que se obteve a melhor resposta foi utilizada para os demais experimentos. Para a análise dos mecanismos de ação da Ang-(1-7) as seguintes drogas foram utilizadas: i) A-779, antagonista específico do Mas (40 nM) e ii) *N^G-nitro-L-arginine methyl Ester* (L-NAME), inibidor da óxido nítrico sintase (10 mg/kg, i.p.). Além disso, foi avaliado o efeito do DIZE (5 mg/kg), ativador da ECA2. As concentrações dessas últimas drogas foram baseadas na literatura (Clayton et al, 1998; Kubo-Inoue et al, 2002; Moura et al, 2005; Trask et al, 2007). A adrenalina foi diluída em salina estéril para a confecção de soluções com as seguintes concentrações: 5 µg/mL; 10 µg/mL; 15 µg/mL e 20 µg/mL. Para os experimentos de eletrofisiologia foi utilizado halotano (0,9 mM, equivalente à inalação a 1,5%) em conjunto com o agonista beta-adrenérgico isoproterenol (100 nM). Durante os experimentos utilizando células isoladas foram administrados: Ang-(1-7) (4 nM) e DIZE (100 µM). As concentrações dessas drogas foram baseadas em um cálculo que considerou o volume de solução que chega à célula, levando em conta o volume sanguíneo dos camundongos de 6% de sua massa corporal.

4.3- *Procedimentos cirúrgicos*

Os ratos permaneceram anestesiados durante os experimentos a partir de um pequeno *set* de respirador para pequenos animais que disponibilizou um volume de 3-5 mL de halotano a cada 40-50 respirações/min. Após a anestesia dos animais, uma cânula feita a partir da fusão de um tubo de polietileno PE-50 de aproximadamente 15 cm com um tubo de polietileno PE-10 de aproximadamente 2 cm foi implantada na veia jugular. A cânula foi preenchida com solução fisiológica (NaCl 0,9%) e a extremidade livre do PE-50 ocluída com um alfinete de metal. Os animais anestesiados foram colocados em decúbito dorsal e os pelos da região cirúrgica foram retirados. Após a assepsia da pele com álcool iodado, uma incisão foi realizada e a musculatura divulsionada para visualização da veia jugular. A cânula foi introduzida na veia para a injeção de adrenalina, Ang-(1-7) e dos inibidores e bloqueadores do SRA.

Eletrodos de agulha foram posicionados subcutaneamente em cada membro para os registros eletrocardiográficos na derivação DII. O ECG e a FC foram monitorados continuamente por um amplificador de ECG (MP100, Biopac System Inc., EUA).

Para a análise dos parâmetros hemodinâmicos, os mesmos procedimentos cirúrgicos foram realizados porém, após a anestesia do animal, foi inserida também uma cânula na artéria femoral. A cânula foi preenchida com solução salina (NaCl 0,9%) e a extremidade livre foi ocluída com um alfinete. Após a calibração prévia do equipamento, a PAM e FC foram registradas através de um sistema de aquisição de dados (MP100, Biopac System Inc., EUA) utilizando transdutores de pressão.

4.4- *Protocolos experimentais*

Para a indução das arritmias cardíacas, foi utilizado o modelo de anestesia com halotano (1,5%) associado à injeção de adrenalina (5; 10; 15 e 20 µg/kg) (Miletich et al, 1978; Kagawa et al, 2005). A dose arritmogênica da adrenalina foi definida como a dose que produziu três ou mais contrações prematuras ventriculares (CPV) dentro de 30 s após a injeção (Miletich et al, 1978, Laster et al, 1990; Kagawa et al, 2005). Esperou-se 10-30 min entre as injeções até a FC tornar-se estável. As arritmias verificadas no ECG foram analisadas obedecendo à convenção de Lambeth sobre diretrizes para o estudo de arritmias (Walker et al, 1988). De acordo com essa convenção, a incidência de arritmias deve ser analisada separadamente dentro das principais categorias, sendo que as CPV são

0,33 NaH₂PO₄; 25 HEPES e 22 glicose) mantida resfriada e sem cálcio. Nessa solução, os corações passaram por um processo de limpeza onde os fragmentos de pulmão e vasos foram removidos deixando apenas o tronco aórtico intacto. Através do tronco aórtico, os corações foram canulados e montados em um sistema de Langendorff de pressão constante. Quando montados no sistema, os corações foram perfundidos com solução de CIB sem cálcio a 37 °C para que todo o sangue que estivesse armazenado nas câmaras cardíacas pudesse ser eliminado. Após a limpeza, os corações foram perfundidos com solução salina CIB a 37 °C, durante 5 min, contendo 0,5 mM de cálcio e as enzimas colagenase 0,8 mg/mL, tripsina 0,067 mg/mL e protease 0,067 mg/mL. Após esse processo, os átrios e o ventrículo direito foram removidos. O ventrículo esquerdo foi então fragmentado e imerso em solução de CIB contendo 1,2 mM de cálcio e as mesmas enzimas da solução anterior. O tecido ventricular esquerdo foi mantido sob essas condições por 15 min a 37 °C. Após esse processo de digestão enzimática, as células isoladas foram centrifugadas. A solução foi então descartada e o *pellet* de células resultante foi ressuspensionado em CIB a 37 °C contendo 1,8 mM de cálcio e albumina 2 mg/mL. Após 5 min essas células foram novamente centrifugadas e o *pellet* resultante foi ressuspensionado em solução salina de Tyrode (em mM: 140 NaCl; 5,4 KCl; 0,5 MgCl₂; 0,33 NaH₂PO₄; 1,8 CaCl₂; 5 HEPES e 11 glicose) com albumina 2 mg/mL, onde foram mantidas por até 8 h para a realização dos experimentos.

4.6- *Análise da contratilidade*

Após o processo de isolamento dos cardiomiócitos ventriculares, foram realizadas as técnicas de contratilidade celular por detecção de bordas, *patch clamp* e microscopia confocal. Para a análise da contratilidade celular, as células foram plaqueadas em uma câmara acoplada a um microscópio invertido (Eclipse, TS 100, Nikon, Japão). Durante os experimentos de contratilidade, as células foram mantidas em uma solução de Tyrode nutritiva contendo em mM: 140 NaCl; 1 MgCl₂; 10 HEPES; 5,4 KCl; 1,8 CaCl₂; 10 glicose ajustada para pH 7.4 com NaOH. Todos os experimentos foram realizados em temperatura ambiente (25-30 °C). Os cardiomiócitos foram estimulados, através de um estimulador de campo conectado a um par de eletrodos de platina imersos na câmara contendo as células, com pulsos de voltagem de 4 ms de duração e intensidade de 80 V

bifásico. A frequência de estimulação foi ajustada a 2 Hz. As células foram visualizadas em um computador com uma câmera NTSC (MyoCamCCD100V, Ionoptix, Milton, MA, USA). Esta imagem foi utilizada para mensurar o encurtamento celular (índice de contratilidade) em resposta a um estímulo elétrico usando um sistema de vídeo detector de bordas (Ionoptix, Milton, MA, USA). A imagem foi obtida usando-se uma frequência de aquisição de 240 Hz. O encurtamento celular foi calculado baseando-se na saída obtida no sistema de detecção de bordas do conversor IonWizard A/D (Ionoptix, Milton, MA, USA). Entre 8-16 contrações consecutivas foram utilizadas para realizar a média de contração de uma determinada célula. Os parâmetros avaliados foram: fração de encurtamento da célula cardíaca, quantidade de arritmias, velocidade máxima de contração e relaxamento, tempo para atingir a contração máxima (*time-to-peak*) e tempo a 50% do relaxamento.

4.7- *Patch clamp*

Os registros eletrofisiológicos foram obtidos utilizando-se um amplificador de *patch clamp* (HEKA EPC9.2) na modalidade *Whole-cell current-clamp* para obtenção dos registros de PA. Uma pipeta de vidro contendo um eletrodo de prata imerso em solução eletrolítica foi aproximada da célula de interesse com a ajuda de um micromanipulador. Após o contato da ponta da pipeta com a membrana da célula, uma pequena tensão foi aplicada no interior da pipeta através de um tubo conectado ao sistema e um selo elétrico foi formado entre o vidro e a membrana da célula de modo que a resistência elétrica à passagem de corrente por essa região de contato célula-pipeta atingisse valores da ordem de $G\Omega$. Uma segunda tensão foi então aplicada a essas células para que o fragmento da membrana em contato com a abertura da pipeta (*patch*) se rompesse, mantendo-se, contudo, o selo formado entre a borda da abertura da pipeta e a membrana, o que caracteriza a configuração *Whole-cell*. Dessa forma, foi possível aferir alterações do potencial de membrana aplicando-se pulsos elétricos de duração e amplitude controlada pelo eletrodo presente na pipeta, utilizando como referência um eletrodo imerso na solução da placa que banha a célula. Após o estabelecimento dessa configuração, as células foram mantidas em repouso por 3 min para que a solução da pipeta se equilibrasse com o meio intracelular. Durante esses experimentos foram

utilizadas pipetas de vidro com resistências variando entre 1-2 M Ω e células que apresentaram resistência em série maior que 8 M Ω após o estabelecimento da configuração *Whole-cell* não foram utilizadas na análise.

Para a mensuração do PA nas células ventriculares isoladas, foi aplicado um pulso de 1000 pA com duração de 3-5 ms, com frequência de 1 Hz, acompanhando então a variação da voltagem desenvolvida através da membrana. Após a estabilização do PA, cada célula foi perfundida com solução de Tyrode acrescida das seguintes substâncias durante um tempo de 5 min: i) halotano 0,9 mM; ii) isoproterenol 100 nM; iii) halotano 0,9 mM + isoproterenol 100 nM; iv) halotano 0,9 mM + isoproterenol 100 nM + Ang-(1-7) 4 nM; ou v) halotano 0,9 mM + isoproterenol 100 nM + DIZE 100 μ M. Os PAs medidos durante esses experimentos foram adquiridos a uma frequência de amostragem de 10 KHz, digitalizados e armazenados em um computador para análise das seguintes variáveis: potencial de repouso da membrana, amplitude do PA, tempo para repolarização do PA em 10%, 50% e 90% da repolarização e taxa máxima de despolarização.

4.8- *Microscopia confocal*

Para medida dos transientes citoplasmáticos de cálcio evocados por estimulação de campo, as células foram marcadas com Fluo-4 em sua forma acetoximetil (AM) éster na concentração de 5 μ M por meio da incubação dos cardiomiócitos isolados por 30 min (temperatura ambiente) em solução de Tyrode protegida da exposição à luz e em leve agitação. As células foram então centrifugadas e ressuspendidas em solução de Tyrode onde permaneceram por mais 10 min para desesterificação da forma AM ester. A solução estoque de 5 mM de Fluo4 AM ester foi confeccionada em solução de DMSO. As mudanças no transiente de cálcio foram medidas através do método de microscopia confocal utilizando o sistema de microscopia confocal Zeiss LSM 510 meta (Zeiss, Alemanha). Para tanto, as células marcadas com Fluo4 AM ester e banhadas com solução de Tyrode foram depositadas em uma lamínula acoplada a uma placa contendo um par de eletrodos paralelos e imersos na solução através dos quais foi feita a excitação das células com uma frequência de 2 Hz em pulsos de 4 ms e 80 V bifásico. Foi incidida uma luz monocromática de 488 nm obtida através de um laser de íons de argônio e a luz emitida durante a interação do fluoróforo (fluo-4 AM) com o cálcio foi transmitida para um

detector do tipo tubo fotomultiplicador após passar por um filtro passa-alta de 505 nm. A linha de varredura (fixada em 512 pixels) foi posicionada ao longo do eixo transversal dos cardiomiócitos evitando-se as regiões nucleares. A resolução espacial variou de 0,1 a 0,3 $\mu\text{m}/\text{pixel}$ e a resolução temporal utilizada foi de 1,92 ms/linha para as medidas de $[\text{Ca}^{+2}]_i$. O tamanho do pinhole foi ajustado para 279 μM , equivalente à uma fatia óptica < 2,0 μm . As mudanças na fluorescência (F) foram normalizadas pela fluorescência basal (F0). Os dados foram registrados com a ajuda do *software* AIM 2009 (Zeiss, Alemanha) e analisados utilizando o *software* Image-J.

4.9- Análise estatística

Todos os dados foram expressos como média \pm E.P.M. Após os testes de normalidade, os resultados foram analisados utilizando os testes de *Wilcoxon* pareado para comparar as medidas de duas amostras dependentes (quantidade de arritmias antes e após a injeção dos compostos) ou *One-way* ANOVA seguido do pós-teste de *Newman-Keuls* com o auxílio do programa *Graph Pad Prism* 5.0. Foi considerado como significativo um p com valor < 0,05.

5- RESULTADOS

5.1- Efeitos antiarritmogênicos da Ang-(1-7)

As arritmias cardíacas foram analisadas de acordo com a convenção de Lambeth sobre diretrizes para o estudo de arritmias (Walker et al, 1988). De acordo com essas diretrizes, em nosso estudo foram observadas arritmias ventriculares classificadas como CPV definidas por um traçado eletrocardiográfico com alta amplitude do complexo QRS, ausência de onda P ou por um ritmo irregular de batimentos cardíacos (definido por irregularidades no segmento R-R) (**Figura 10**).

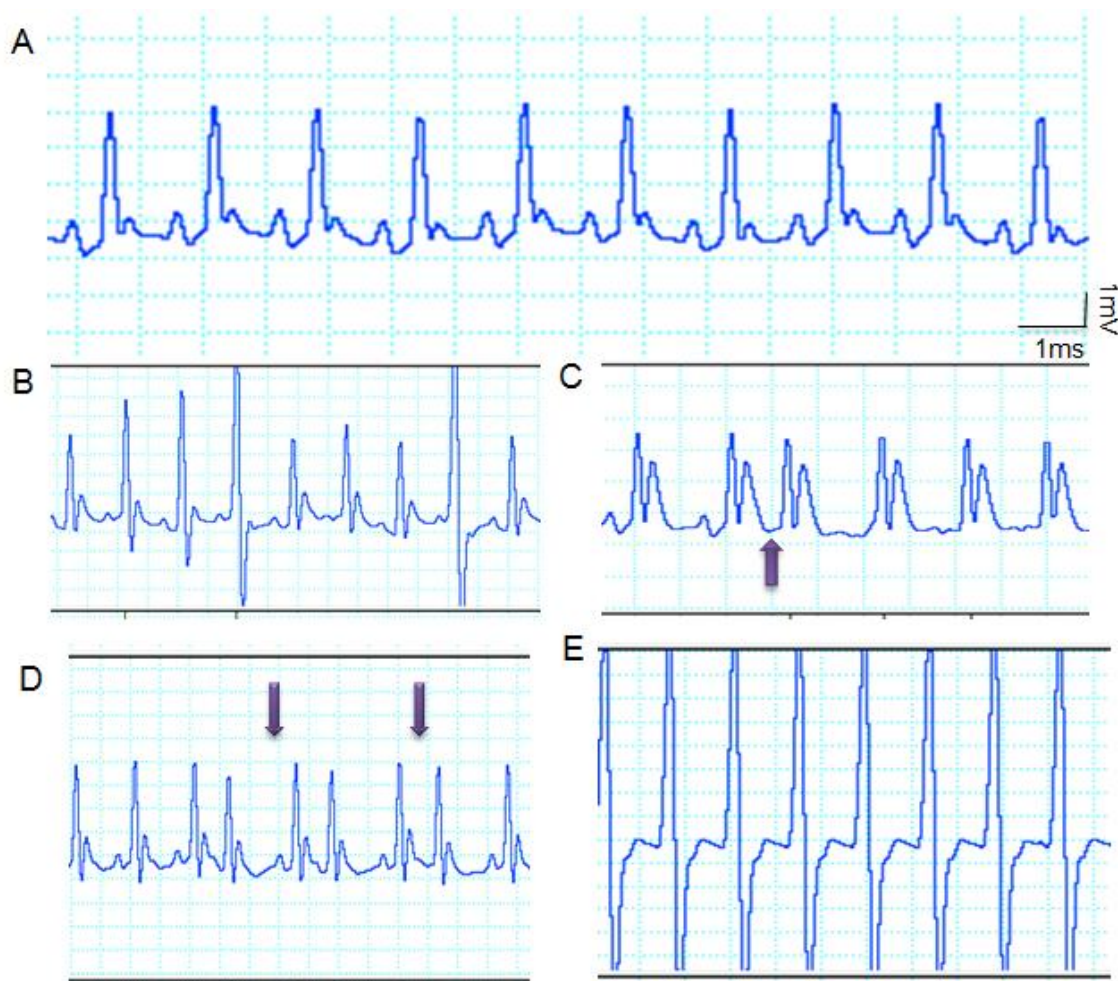


Figura 10: Registros eletrocardiográficos mostrando os eventos arrítmicos analisados de acordo com a convenção de Lambeth. A: controle, B: alta amplitude do complexo QRS, C: ausência de onda P, D: ritmo irregular, E: taquicardia ventricular.

Analisamos os efeitos da Ang-(1-7) nas arritmias cardíacas em três concentrações diferentes (0,04 nM, 4 nM e 400 nM) (**Figura 11**). Foi observado que a Ang-(1-7) na concentração de 4 nM apresenta atividade antiarritmogênica significativa [controle: 49 ± 13 eventos arrítmicos e Ang-(1-7): 16 ± 4 eventos arrítmicos]. O mesmo não foi encontrado para as concentrações de 0,04 nM [controle: 33 ± 10 eventos arrítmicos e Ang-(1-7): 51 ± 7 eventos arrítmicos] e 400 nM [controle: 54 ± 19 eventos arrítmicos e Ang-(1-7): 96 ± 15 eventos arrítmicos]. Devido ao seu efeito significativo, a concentração de 4 nM de Ang-1-7 foi utilizada nos demais experimentos.

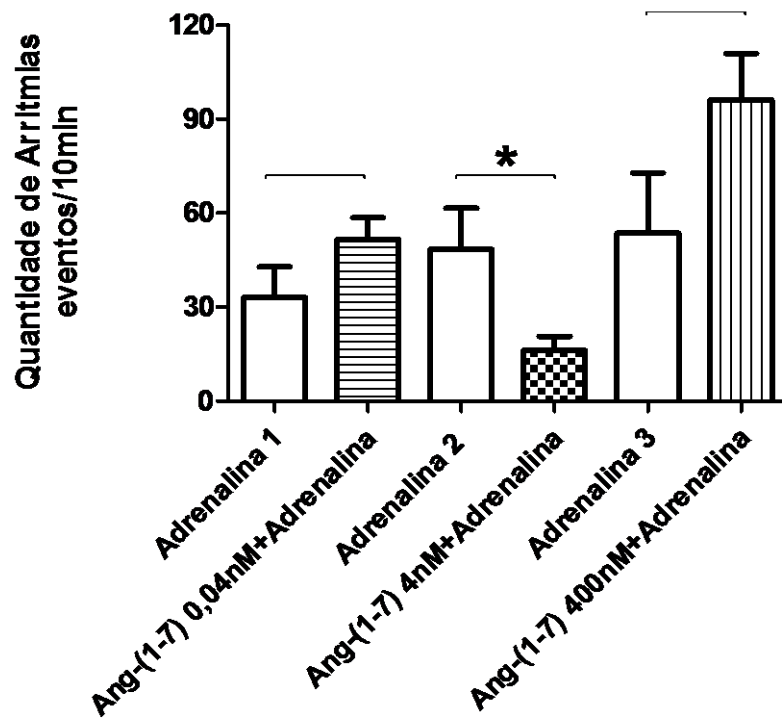


Figura 11: Efeitos da Ang-(1-7) em três concentrações diferentes [0,04 nM (n=5), 4 nM (n=11) e 400 nM (n=5)] nas arritmias cardíacas. A Ang-(1-7) 4 nM reduziu de forma significativa a quantidade de arritmias quando comparado ao respectivo controle (injeção de adrenalina + salina). Resultados expressos como média \pm E.P.M. (* $p < 0,05$; teste de Wilcoxon pareado entre os grupos Adrenalina 1 x Ang-(1-7) 0,04 nM; Adrenalina 2 x Ang-(1-7) 4 nM e Adrenalina 3 x Ang-(1-7) 400 nM).

Como controle da preparação foi injetado adrenalina mais salina para análise de possíveis efeitos do veículo utilizado para a diluição de todas as drogas e peptídeos. Não houve alteração significativa após administração de salina [controle: 46 ± 17 eventos arrítmicos e adrenalina+salina: 68 ± 10 eventos arrítmicos] (**Figura 12**).

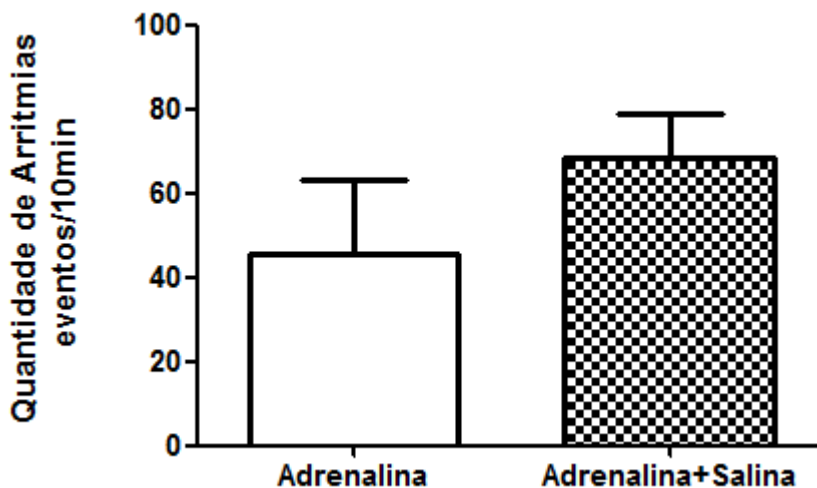


Figura 12: Eventos arrítmicos antes e depois da injeção de salina (n= 6). A injeção de salina não alterou de forma significativa a quantidade de arritmias. Resultados expressos como média \pm E.P.M. ($p > 0,05$; teste de *Wilcoxon*).

5.2- Mecanismos de ação da Ang-(1-7)

A primeira ferramenta farmacológica utilizada para a análise dos mecanismos de ação da Ang-(1-7) foi o A-779, antagonista do receptor Mas. Nossos resultados mostraram que a injeção de A-779 junto com Ang-(1-7) não foi capaz de diminuir significativamente os eventos arrítmicos [controle: 45 ± 12 eventos arrítmicos e Ang-(1-7) + A-779: 38 ± 12 eventos arrítmicos], indicando que o efeito da Ang-(1-7) é dependente do Mas (**Figura 13**).

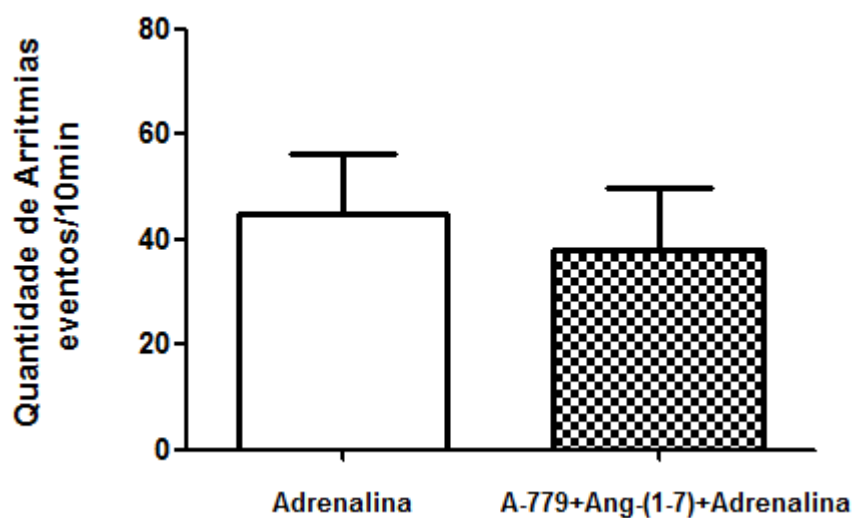


Figura 13: Eventos arrítmicos antes e depois da injeção A-779 + Ang-(1-7) + adrenalina (n=6). O bloqueio do Mas aboliu completamente o efeito da Ang-(1-7) nas arritmias cardíacas. Resultados expressos como média \pm E.P.M. ($p > 0,05$; teste de *Wilcoxon*).

A injeção individual de A-779 não provocou alterações significativas nas arritmias cardíacas [controle: 42 ± 14 eventos arrítmicos e A-779: 41 ± 14 eventos arrítmicos] (**Figura 14**).

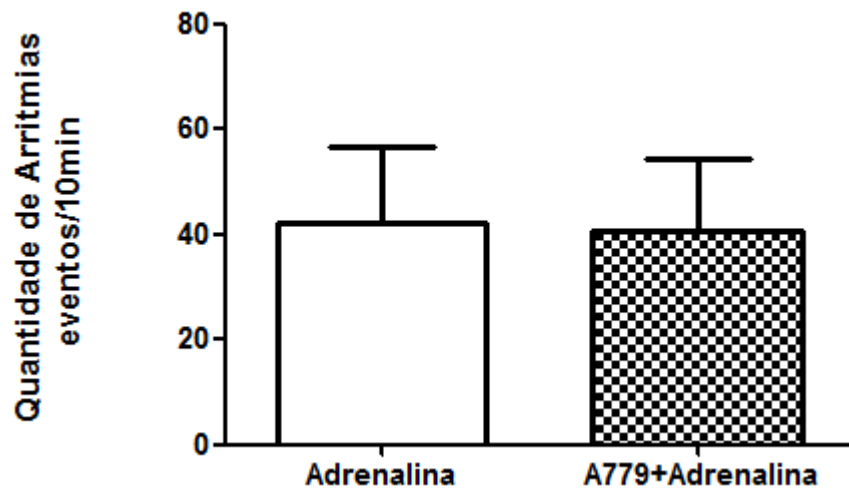


Figura 14: Eventos arrítmicos antes e depois da injeção A-779 + adrenalina (n=6). A injeção do A-779 não alterou de forma significativa a quantidade de arritmias quando comparado ao respectivo controle (injeção de adrenalina + salina). Resultados expressos como média \pm E.P.M. ($p > 0,05$; teste de *Wilcoxon*).

Já foi descrito que o NO participa da cascata de sinalização da Ang-(1-7) sendo liberado após a ligação da Ang-(1-7) com o Mas (Gomes et al, 2010). Assim, de acordo com esses resultados, observamos que a injeção de L-NAME bloqueou o efeito de redução das arritmias cardíacas [controle: 15 ± 5 eventos arrítmicos e Ang-(1-7) + L-NAME: 53 ± 21 eventos arrítmicos] (**Figura 15**).

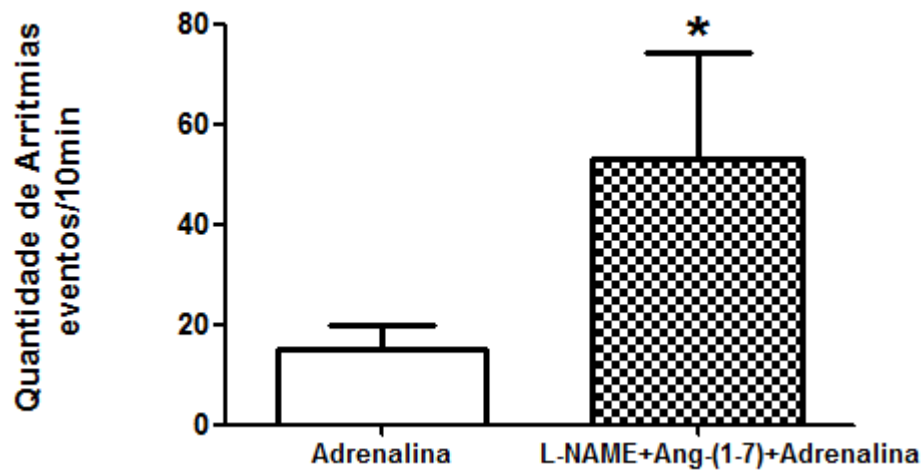


Figura 15: Eventos arrítmicos antes e depois da injeção de L-NAME + Ang-(1-7) + adrenalina (n=5). A inibição da NO sintase aboliu completamente o efeito da Ang-(1-7) nas arritmias cardíacas. Resultados expressos como média ± E.P.M. (* $p < 0,05$; teste de *Wilcoxon*).

A administração individual de L-NAME aumentou de forma significativa as arritmias cardíacas [controle: 53 ± 9 eventos arrítmicos e L-NAME: 127 ± 31 eventos arrítmicos] (**Figura 16**).

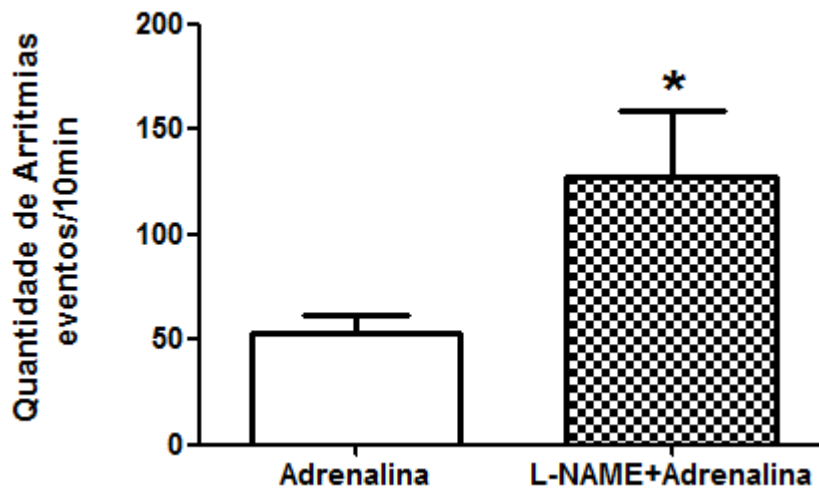


Figura 16: Eventos arrítmicos antes e depois da injeção L-NAME + adrenalina (n=6). A injeção de L-NAME aumentou de forma significativa a quantidade de arritmias quando comparado ao respectivo controle (injeção de adrenalina + salina). Resultados expressos como média \pm E.P.M. (* $p < 0,05$; teste de *Wilcoxon*).

Para confirmar nossos resultados, injetamos um ativador da ECA2 (DIZE) com o objetivo de aumentar a quantidade de Ang-(1-7) endógena. Observamos que o DIZE foi capaz de reduzir de forma significativa a quantidade de eventos arrítmicos [controle: 38 ± 12 eventos arrítmicos e DIZE: 12 ± 8 eventos arrítmicos] (**Figura 17**).

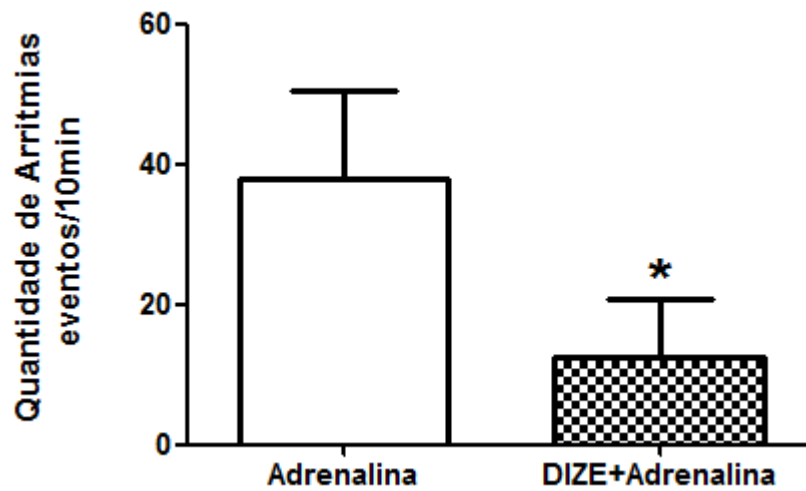


Figura 17: Eventos arrítmicos antes e depois da injeção de DIZE (n=6). O DIZE reduziu de forma significativa a quantidade de arritmias quando comparado ao controle (injeção de adrenalina + salina). Resultados expressos como média \pm E.P.M. (* $p < 0,05$; teste de *Wilcoxon*).

Surpreendentemente, o co-tratamento com o A-779 não bloqueou o efeito do DIZE na redução da quantidade de arritmias, sugerindo que o Mas não participa desse efeito do DIZE [controle: 30 ± 4 eventos arrítmicos e DIZE+A-779: 6 ± 1 eventos arrítmicos] (**Figura 18**).

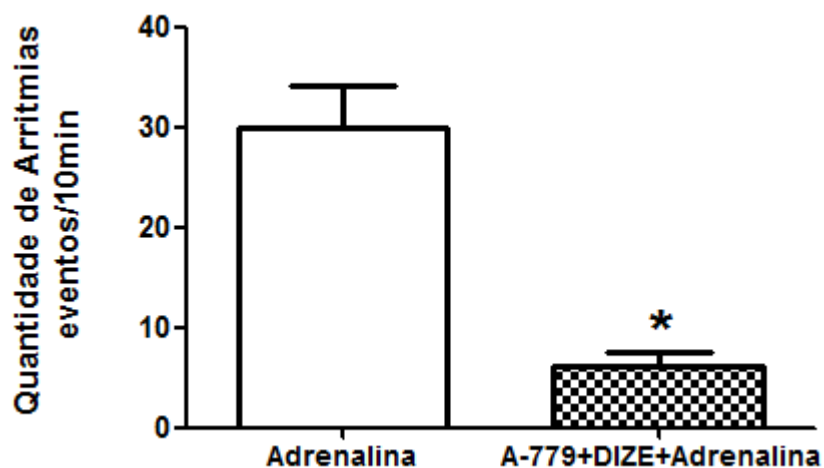


Figura 18: Eventos arrítmicos antes e depois da injeção de DIZE + A-779 + adrenalina (n=5). O bloqueio do Mas não aboliu o efeito do DIZE nas arritmias cardíacas. Resultados expressos como média \pm E.P.M. (* $p < 0,05$; teste de *Wilcoxon*).

Para confirmar esse dado, injetamos A-779 e esperamos um intervalo de tempo de 1 min para injetar o DIZE. Novamente, observamos uma redução significativa dos eventos arrítmicos [controle: 24 ± 17 eventos arrítmicos e A-779+1min+DIZE: 10 ± 7 eventos arrítmicos] (**Figura 19**).

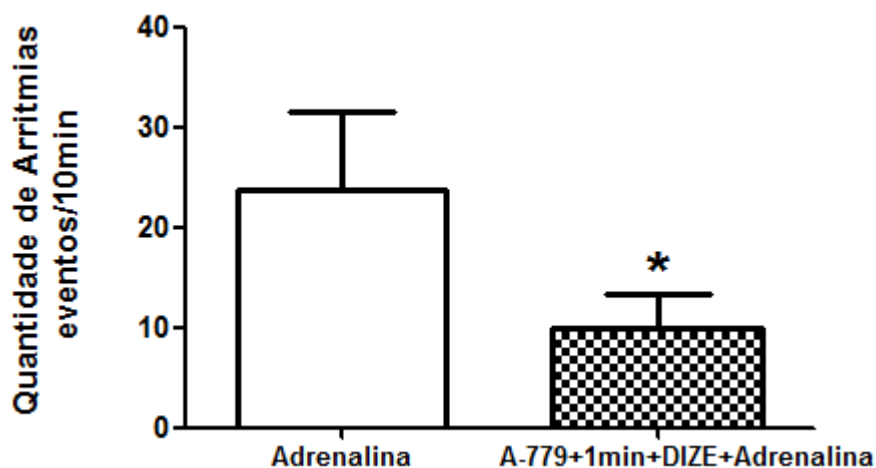


Figura 19: Eventos arrítmicos antes e depois da injeção de A-779 + 1min + DIZE + adrenalina (n=5). O bloqueio do Mas não aboliu o efeito do DIZE nas arritmias cardíacas. Resultados expressos como média ± E.P.M. (*p<0,05; teste de *Wilcoxon*).

Em outro grupo de animais injetamos L-NAME mais DIZE e foi observada uma redução significativa das arritmias [controle: 36±9 eventos arrítmicos e L-NAME+DIZE: 17±9 eventos arrítmicos], indicando que a inibição da NO sintase não abole o efeito do DIZE nas arritmias cardíacas (**Figura 20**).

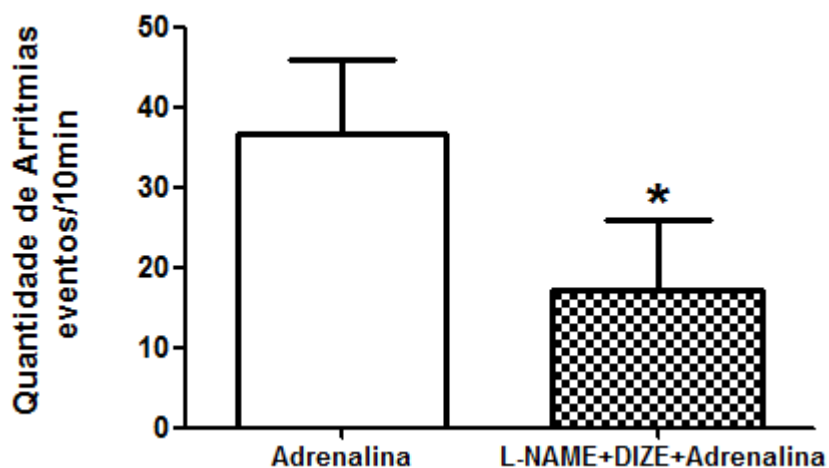


Figura 20: Eventos arrítmicos antes e depois da injeção de L-NAME + DIZE + adrenalina (n= 8). A inibição da NO sintase não aboliu o efeito do DIZE nas arritmias cardíacas. Resultados expressos como média ± E.P.M. (*p<0,05; teste de *Wilcoxon*).

A fim de verificar se as amostras de animais utilizadas representaram a população e se não houve flutuações entre os grupos, comparamos os controles de todos os grupos experimentais. Não houve diferença significativa na quantidade de arritmias entre todos os grupos controles (**Figura 21**).

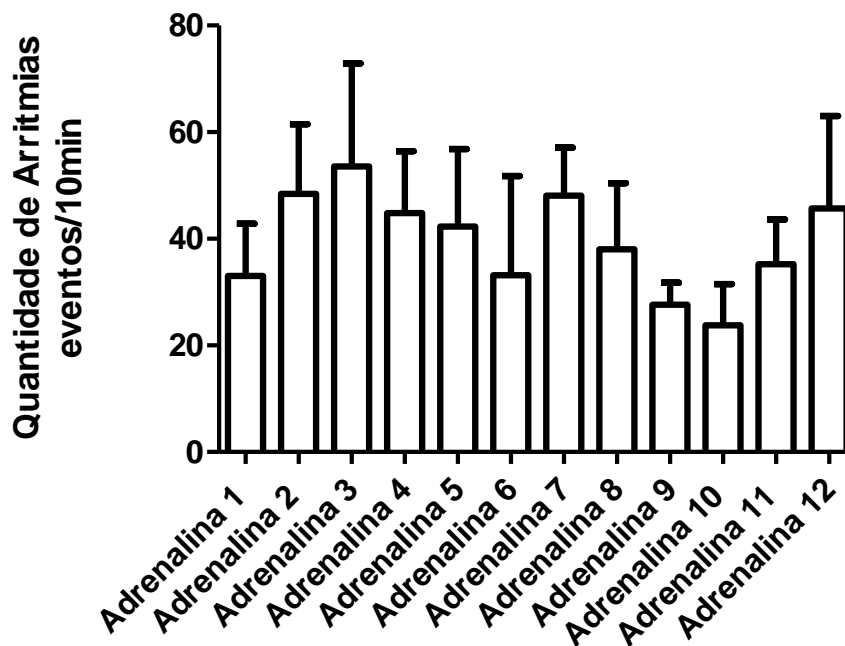


Figura 21: Comparação da quantidade de eventos arrítmicos entre todos os grupos controles (injeção de adrenalina + salina). Não houve diferença significativa entre os grupos. Resultados expressos como média \pm E.P.M. ($p > 0,05$; *One-way ANOVA* seguido de *Newman-Keuls*).

5.3- Análise de parâmetros hemodinâmicos

Foi observado que a Ang-(1-7) (4 nM) não alterou os padrões hemodinâmicos de PAM [estabilização: 74,4 \pm 3,1 mmHg; adrenalina: 106,1 \pm 4,8 mmHg e adrenalina+Ang-(1-7): 114,4 \pm 4,4 mmHg] e de FC [estabilização: 287,5 \pm 4,9 bpm; adrenalina: 320,5 \pm 19,6 bpm e adrenalina+Ang-(1-7): 337 \pm 17 bpm] (**Figura 22**).

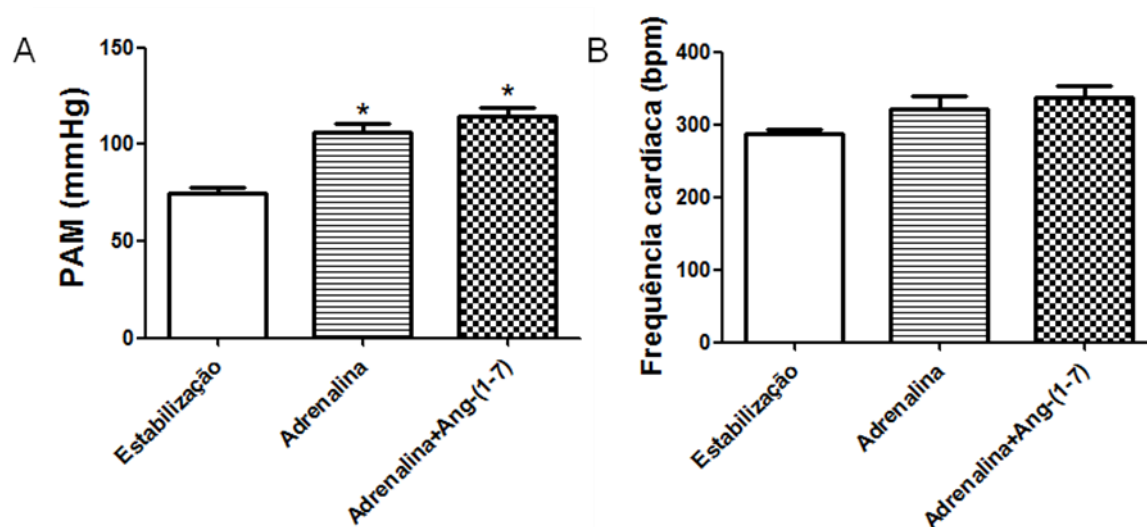


Figura 22: Efeitos da adrenalina associada ou não a Ang-(1-7) na (A) pressão arterial média (PAM) e na (B) frequência cardíaca (FC). Não houve diferenças significativas entre a injeção de adrenalina sozinha e a administração de adrenalina + Ang-(1-7) nesses parâmetros (n= 20). Resultados expressos como média \pm E.P.M (* $p < 0,05$; Estabilização vs. Adrenalina e Estabilização vs. Ang-(1-7) + Adrenalina. *One-way* ANOVA seguido do pós-teste de *Newman-Keuls*).

5.4- Análise das arritmias e da contratilidade de cardiomiócitos isolados

A fim de confirmar os efeitos antiarrítmicos da Ang-(1-7), bem como analisar os mecanismos envolvidos nessa proteção a nível celular, cardiomiócitos ventriculares foram isolados e utilizados em três técnicas experimentais (contratilidade, *patch clamp* e microscopia confocal). A partir da técnica de contratilidade foi observado que a Ang-(1-7) e o DIZE provocaram uma redução significativa na quantidade de arritmia (Controle: $1,5 \pm 0,5$; Hal: $1,2 \pm 0,6$; Iso: $2,2 \pm 0,8$; Hal+Iso: $29,9 \pm 4,1$; Hal+Iso+Ang-(1-7): $5,6 \pm 1,8$ e Hal+Iso+DIZE: $5,4 \pm 1,5$ eventos arrítmicos). Além disso, a proporção de células que desenvolveram eventos arrítmicos foi reduzida na presença da Ang-(1-7) ou do DIZE (**Figura 23**). Essas arritmias correspondem a contrações extras não advindas da estimulação de campo através dos eletrodos imersos nas placas e/ou de eventos de não responsividade celular à estimulação de campo, como pode ser observado nos traçados representativos da **Figura 24**.

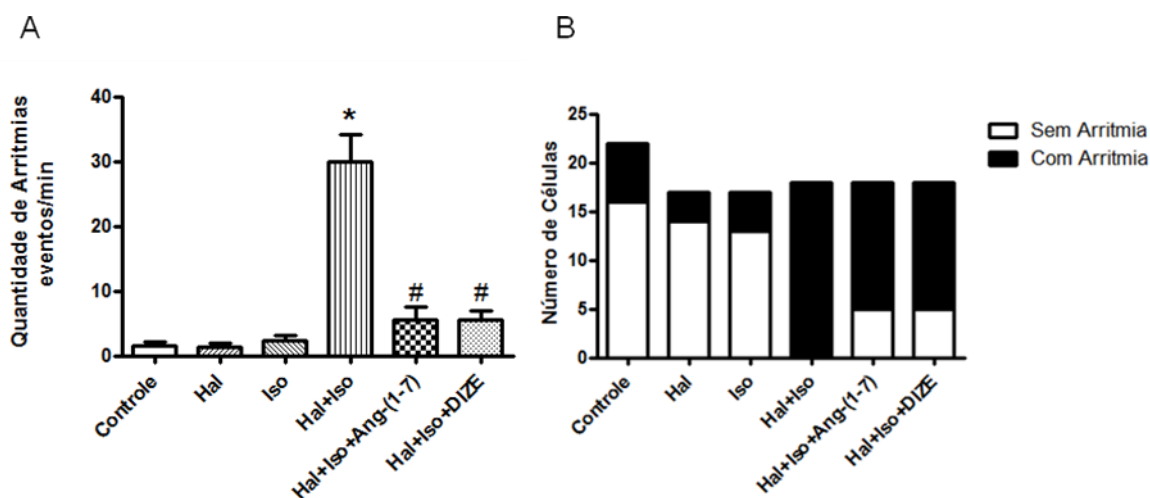


Figura 23: Quantificação das arritmias a partir da técnica de contratilidade celular. A: Quantidade de arritmia por minuto, por célula. B: Proporção de células que desenvolveram ou não eventos de arritmia. Hal: halotano; Iso: isoproterenol. Controle (n=22); Hal (n=17); Iso (n=17); Hal+Iso (n=18); Hal+Iso+Ang-(1-7) (n=18); Hal+Iso+DIZE (n=18). Resultados expressos como média \pm E.P.M (* $p < 0,05$ em relação ao grupo controle; # $p < 0,05$ em relação ao grupo Hal+Iso. *One-way* ANOVA seguido pelo pós-teste de *Newman-Keuls*).

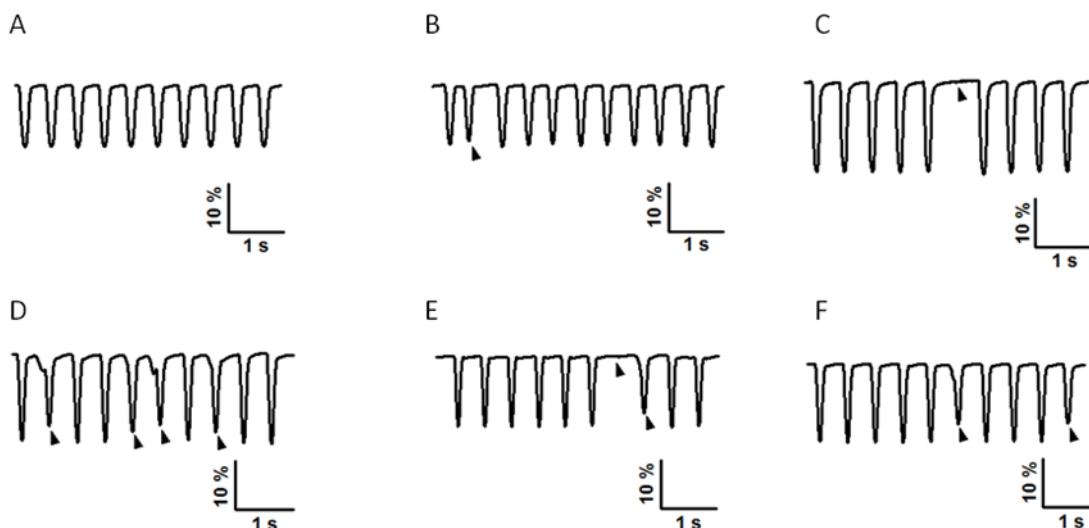


Figura 24: Representação do traçado de contratilidade mostrando alterações na contração (aritmias). A: controle; B: halotano; C: isoproterenol; D: halotano + isoproterenol; E: halotano + isoproterenol + Ang-(1-7); F: halotano + isoproterenol + DIZE. As setas indicam os eventos arrítmicos.

Além disso, foi observado um aumento significativo na fração de encurtamento nos grupos isoproterenol, halotano + isoproterenol, halotano + isoproterenol + Ang-(1-7) e halotano + isoproterenol + DIZE quando comparados ao grupo controle (Controle: $12,4 \pm 0,6$; Hal: $12,1 \pm 0,6$; Iso: $17,0 \pm 0,6$; Hal+Iso: $15,4 \pm 0,5$; Hal+Iso+Ang-(1-7): $15,1 \pm 0,7$ e Hal+Iso+DIZE: $17,5 \pm 0,4$ porcentagem de encurtamento) (**Figura 25**).

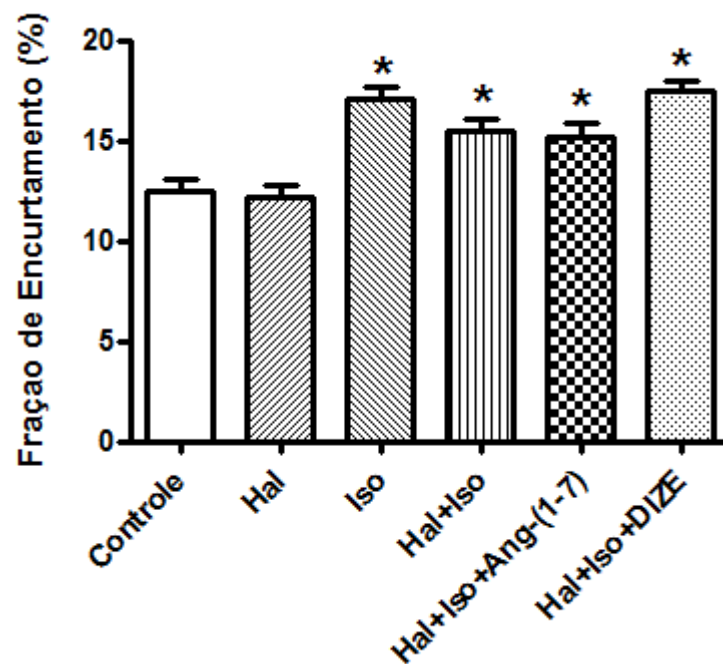


Figura 25: Fração de encurtamento dos cardiomiócitos. Um aumento significativo foi observado nos grupos isoproterenol, halotano + isoproterenol, halotano + isoproterenol + Ang-(1-7) e halotano + isoproterenol + DIZE. Hal: halotano; Iso: isoproterenol. Controle (n=22); Hal (n=17); Iso (n=17); Hal+Iso (n=18); Hal+Iso+Ang-(1-7) (n=18); Hal+Iso+DIZE (n=18). Resultados expressos como média \pm E.P.M (* $p < 0,05$ em relação ao grupo controle; *One-way ANOVA* seguido pelo pós-teste de *Newman-Keuls*).

Resultados similares foram encontrados em relação as taxas máximas de contração [Controle: $330,3 \pm 27,8$; Hal: $321,8 \pm 31,6$; Iso: $535,5 \pm 34,9$; Hal+Iso: $472,7 \pm 29,9$; Hal+Iso+Ang-(1-7): $525,7 \pm 33,2$ e Hal+Iso+DIZE: $642,9 \pm 41,1$ m/s] e de relaxamento (dL/dt) [Controle: $277,4 \pm 19,7$; Hal: $280,3 \pm 29,6$; Iso: $404,6 \pm 34,5$; Hal+Iso: $398,3 \pm 25,2$;

Hal+Iso+Ang-(1-7): $442,6 \pm 25,3$; e Hal+Iso+DIZE: $518,0 \pm 36,8$ m/s]. Porém, no grupo de células incubadas com DIZE houve um aumento adicional desses parâmetros quando comparado ao grupo halotano+isoproterenol (**Figura 26**).

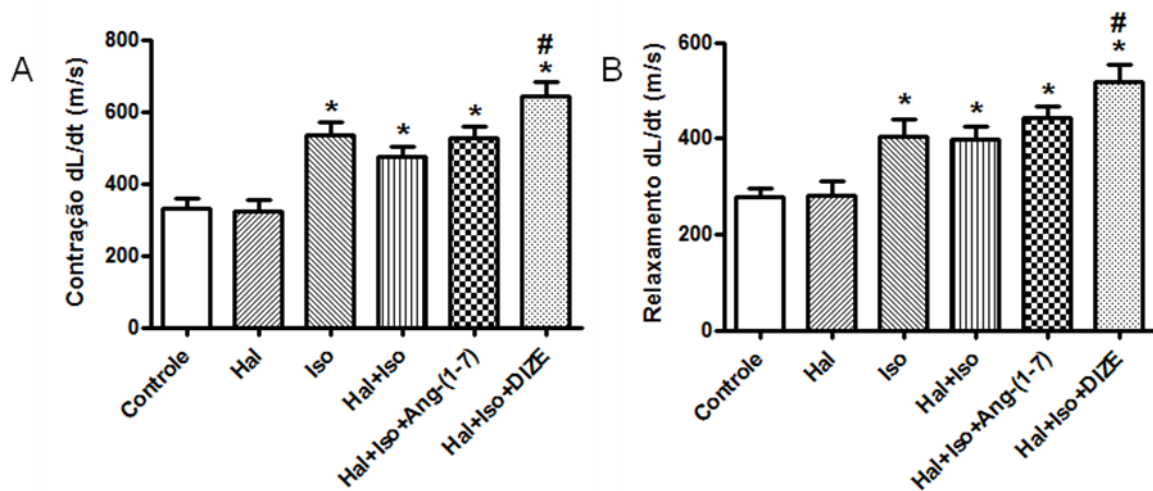


Figura 26: Taxa máxima de (A) contração e (B) relaxamento. Hal: halotano; Iso: isoproterenol. Controle (n=22); Hal (n=17); Iso (n=17); Hal+Iso (n=18); Hal+Iso+Ang-(1-7) (n=18); Hal+Iso+DIZE (n=18). Resultados expressos como média \pm E.P.M (* $p < 0,05$ em relação ao grupo controle; # $p < 0,05$ em relação ao grupo Hal+Iso. *One-way ANOVA* seguido pelo pós-teste de *Newman-Keuls*).

Os experimentos de contratilidade também demonstraram uma diminuição do tempo para atingir o pico máximo de contração (*time-to-peak*) nos grupos isoproterenol, halotano + isoproterenol, halotano + isoproterenol + Ang-(1-7) e halotano + isoproterenol + DIZE em relação ao controle (Controle: $107,5 \pm 4,0$; Hal: $100,6 \pm 3,8$; Iso: $84,3 \pm 3,1$; Hal+Iso: $91,1 \pm 4,3$; Hal+Iso+Ang-(1-7): $82,7 \pm 3,2$ e Hal+Iso+DIZE: $80,8 \pm 3,0$ ms). Isso também foi evidenciado na velocidade de relaxamento (Controle: $57,9 \pm 4,5$; Hal: $50,7 \pm 2,9$; Iso: $43,1 \pm 2,3$; Hal+Iso: $41,9 \pm 1,7$; Hal+Iso+Ang-(1-7): $39,4 \pm 1,5$ e Hal+Iso+DIZE: $39,7 \pm 1,8$ ms) (**Figura 27**).

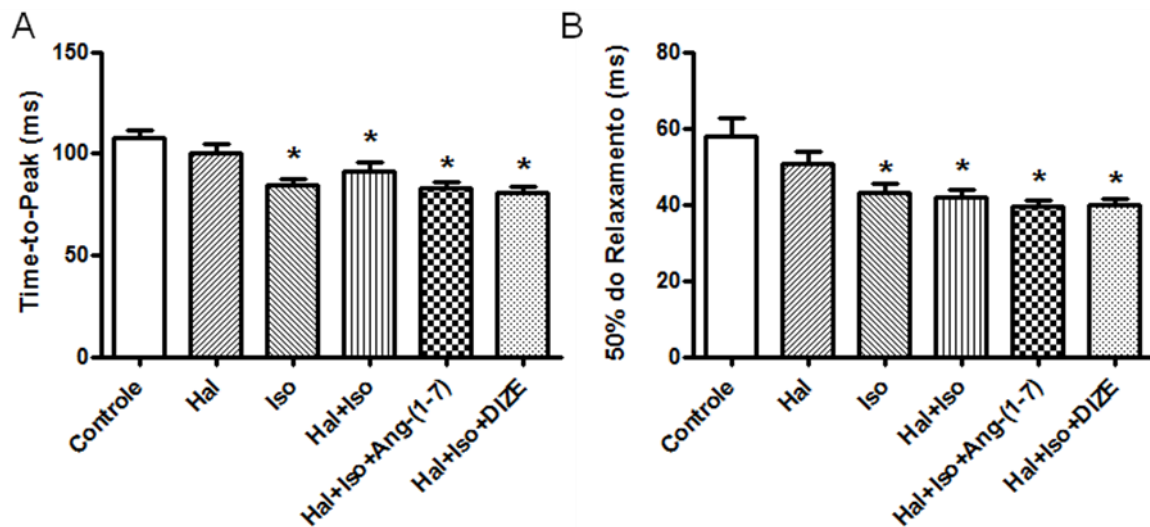


Figura 27: Tempo para atingir o pico máximo de contração (*time-to-peak*) (A) e tempo para atingir 50% de relaxamento (B). Hal: halotano; Iso: isoproterenol. Controle (n=22); Hal (n=17); Iso (n=17); Hal+Iso (n=18); Hal+Iso+Ang-(1-7) (n=18); Hal+Iso+DIZE (n=18). Resultados expressos como média \pm E.P.M (* $p < 0,05$ em relação ao grupo controle; *One-way* ANOVA seguido pelo pós-teste de *Newman-Keuls*).

5.5- Análise do potencial de ação

Para avaliar se a redução *in vivo* das arritmias causada pela Ang-(1-7) está relacionada com alterações na excitabilidade dos cardiomiócitos, o que poderia alterar o acoplamento excitação-contração, nós analisamos o PA. Assim, através da técnica de *patch clamp* foi observado que a Ang-(1-7) e o DIZE promovem um encurtamento do PA (**Figura 28**).

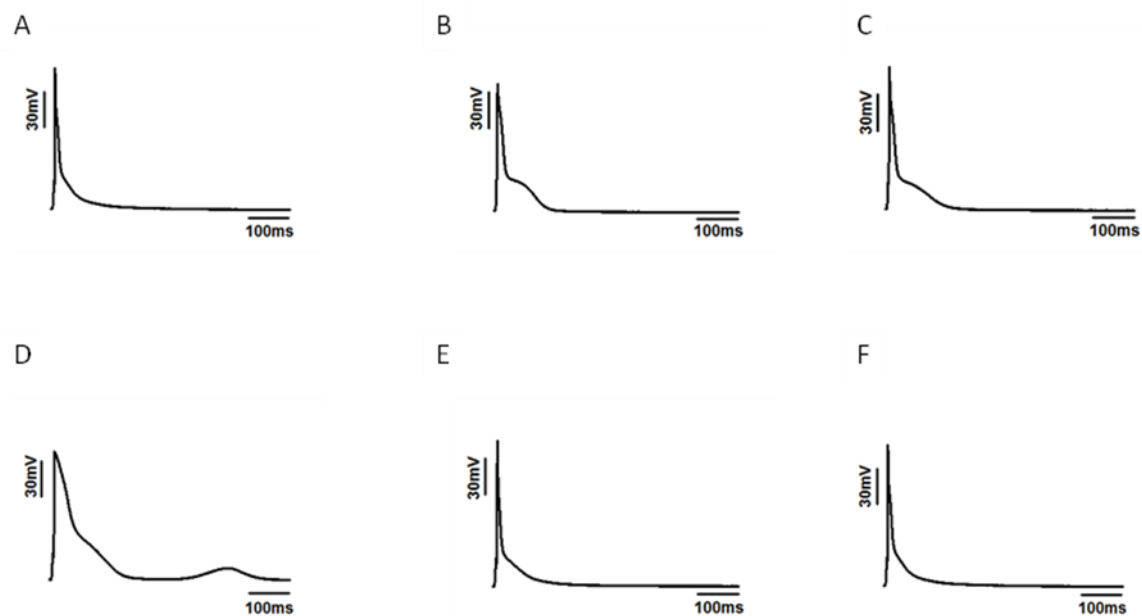


Figura 28: Figura representativa dos traçados do potencial de ação. A: controle; B: halotano; C: isoproterenol; D: halotano + isoproterenol; E: halotano + isoproterenol + Ang-(1-7); F: halotano + isoproterenol + DIZE.

A Ang-(1-7) e o DIZE promoveram uma redução significativa na fase de repolarização do PA (RPA90%) (Controle: $109,6 \pm 8,0$; Hal: $112,2 \pm 24,0$; Iso: $103,0 \pm 9,3$; Hal+Iso: $105,2 \pm 8,8$; Hal+Iso+Ang-(1-7): $64,8 \pm 5,3$ e Hal+Iso+DIZE: $62,9 \pm 6,8$ ms). Considerando as outras fases de repolarização (RPA10% e RPA50%), esses compostos preveniram um aumento significativo do tempo de repolarização quando administrados juntamente com o halotano + isoproterenol (**Figura 29**).

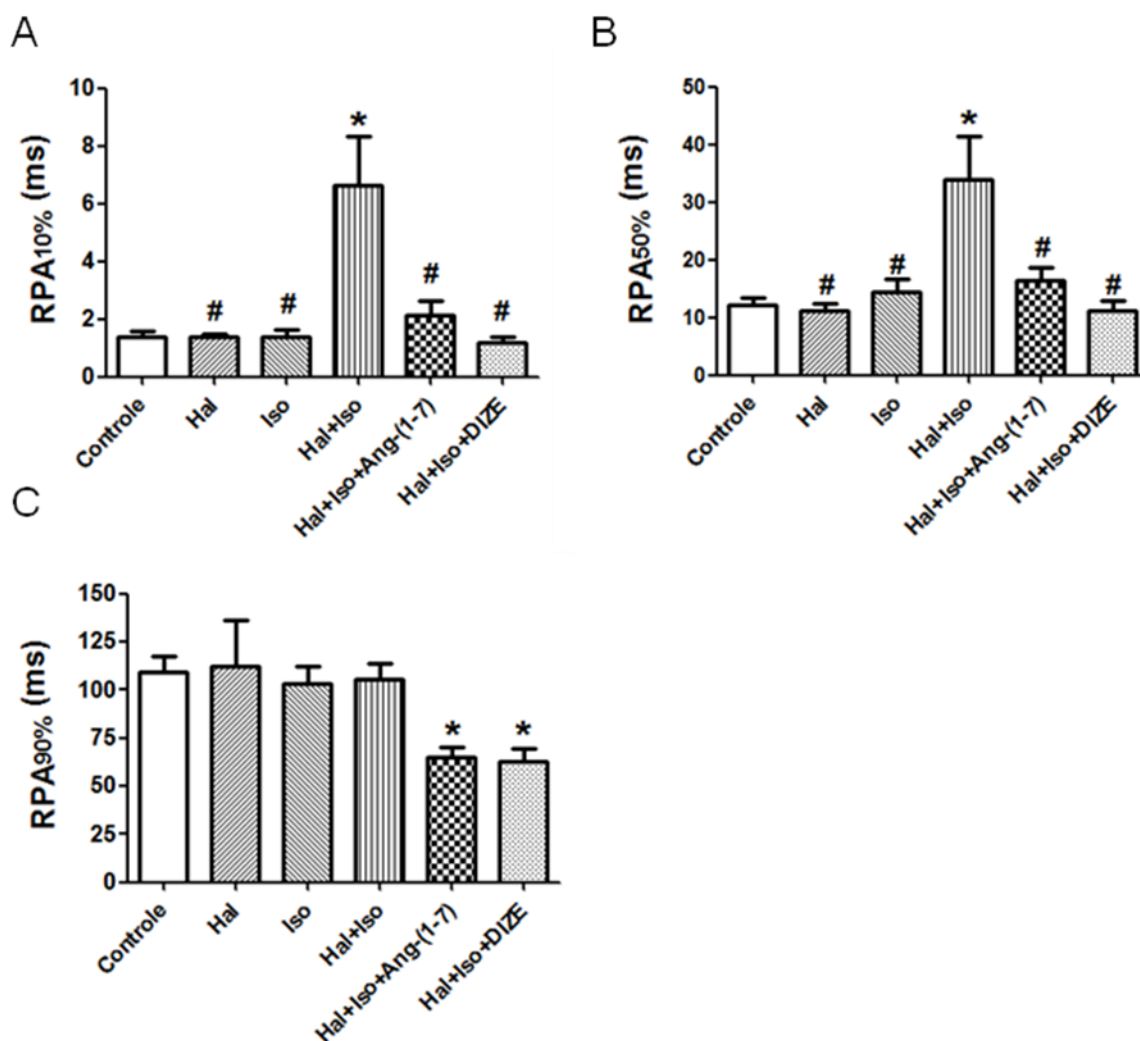


Figura 29: Tempo para repolarização do potencial de ação (RPA) a (A) 10%, (B) 50% e (C) 90%. Hal: halotano; Iso: isoproterenol. Controle (n= 54); Hal (n=11); Iso (n=12); Hal+Iso (n=18); Hal+Iso+Ang-(1-7) (n=23); Hal+Iso+DIZE (n=13). Resultados expressos como média \pm E.P.M (* $p < 0,05$ em relação ao grupo controle; # $p < 0,05$ em relação ao grupo Hal+Iso. *One-way ANOVA* seguido pelo pós-teste *de Newman-Keuls*).

Além disso, esses compostos também promoveram significativa hiperpolarização do potencial de repouso quando comparado ao controle (Controle: $-68,0 \pm 0,4$; Hal: $-68,0 \pm 0,6$; Iso: $-73,0 \pm 2,8$; Hal+Iso: $-70,8 \pm 1,0$; Hal+Iso+Ang-(1-7): $-72,9 \pm 1,1$ e Hal+Iso+DIZE: $-73,9 \pm 1,3$ mV) (**Figura 30**).

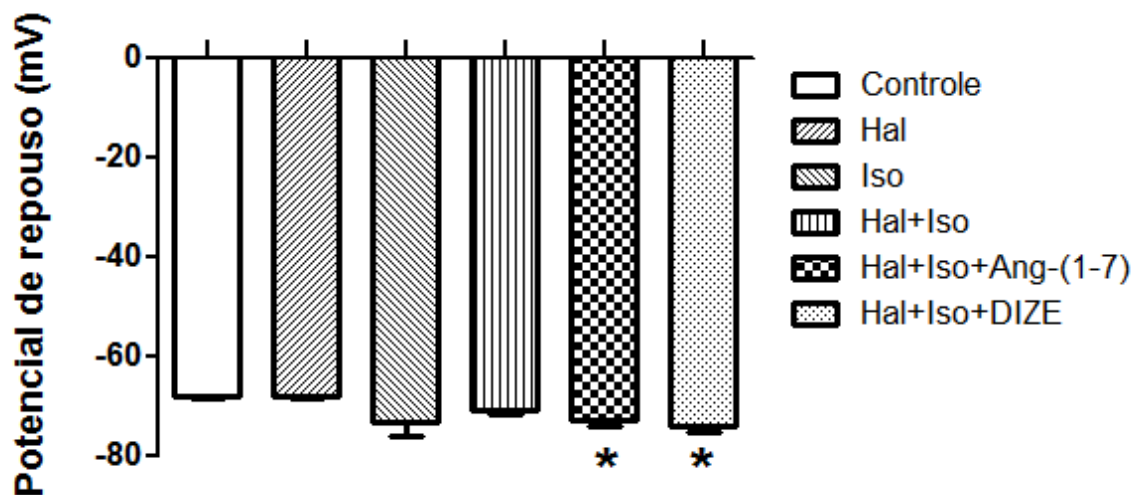


Figura 30: Potencial de repouso. A Ang-(1-7) e o DIZE promoveram uma redução significativa do potencial de repouso quando comparado ao controle. Hal: halotano; Iso: isoproterenol. Controle (n= 54); Hal (n=11); Iso (n=12); Hal+Iso (n=18); Hal+Iso+Ang-(1-7) (n=23); Hal+Iso+DIZE (n=13). Resultados expressos como média \pm E.P.M (* $p < 0,05$ em relação ao grupo controle. *One-way* ANOVA seguido pelo pós-teste de *Newman-Keuls*).

Considerando a amplitude do PA, apenas o isoproterenol sozinho induziu um pequeno aumento nesse parâmetro (Controle: $114,3 \pm 1,0$; Hal: $110,7 \pm 3,5$; Iso: $116,6 \pm 1,7$; Hal+Iso: $106,7 \pm 2$; Hal+Iso+Ang-(1-7): $108,4 \pm 2,0$ e Hal+Iso+DIZE: $108,2 \pm 1,9$ mV) (**Figura 31**).

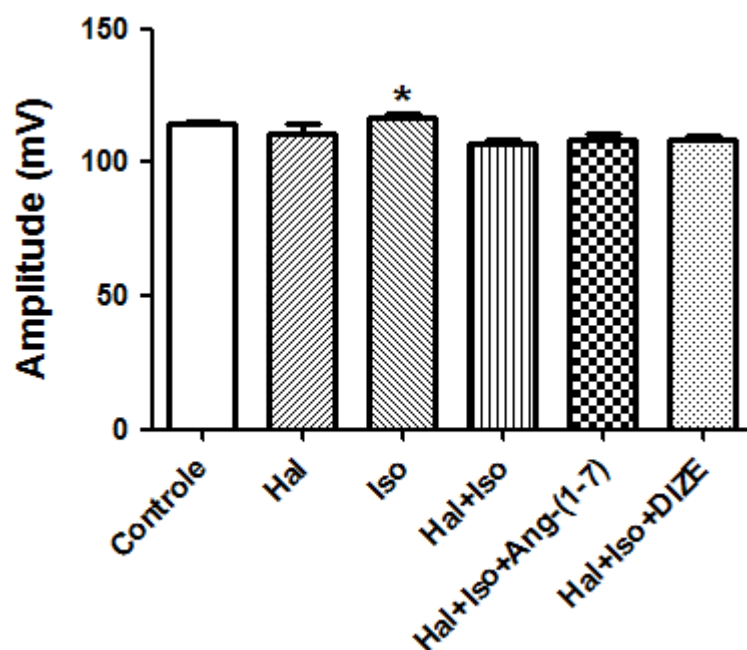


Figura 31: Amplitude do potencial de ação. Houve diferença significativa apenas com a administração de isoproterenol sozinho. Hal: halotano; Iso: isoproterenol. Controle (n=54); Hal (n=11); Iso (n=12); Hal+Iso (n=18); Hal+Iso+Ang-(1-7) (n=23); Hal+Iso+DIZE (n=13). Resultados expressos como média \pm E.P.M (* $p < 0,05$ em relação ao grupo controle. *One-way* ANOVA seguido pelo pós-teste de *Newman-Keuls*).

Analisando a taxa de despolarização máxima do PA (dV/dt) houve uma redução significativa nos grupos halotano, halotano + isoproterenol, halotano + isoproterenol + Ang-(1-7) e halotano + isoproterenol + DIZE quando comparado ao controle (Controle: $201,6 \pm 8,2$; Hal: $140,7 \pm 11,4$; Iso: $198,1 \pm 15,3$; Hal+Iso: $143,9 \pm 11,3$; Hal+Iso+Ang-(1-7): $147,6 \pm 9,7$ e Hal+Iso+DIZE: $134,7 \pm 11,4$ mV) (**Figura 32**).

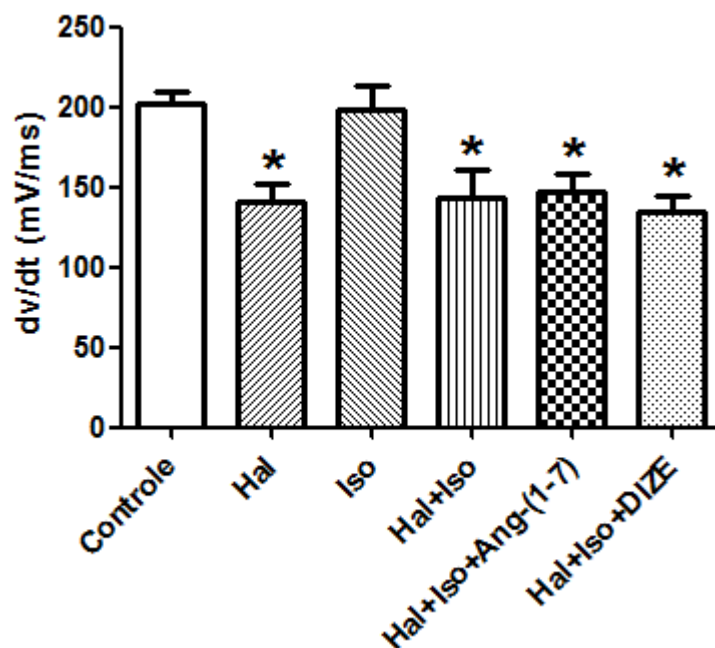


Figura 32: Despolarização máxima do PA (dV/dt). Hal: halotano; Iso: isoproterenol. Controle (n= 54); Hal (n=11); Iso (n=12); Hal+Iso (n=18); Hal+Iso+Ang-(1-7) (n=23); Hal+Iso+DIZE (n=13). Resultados expressos como média \pm E.P.M (* $p < 0,05$ em relação ao grupo controle. *One-way ANOVA* seguido pelo pós-teste de *Newman-Keuls*).

5.6- Análise do transiente de cálcio

No nosso estudo observamos que tanto a Ang-(1-7) como o DIZE foram capazes de reduzir de forma significativa a quantidade das *waves* de cálcio (Controle: $0,3 \pm 0,1$; Hal: $0,4 \pm 0,1$; Iso: $1,0 \pm 0,1$; Hal+Iso: $3,9 \pm 0,2$; Hal+Iso+Ang-(1-7): $2,2 \pm 0,1$ e Hal+Iso+DIZE: $2,0 \pm 0,1$ número de *waves*/10s/célula (**Figura 33**).

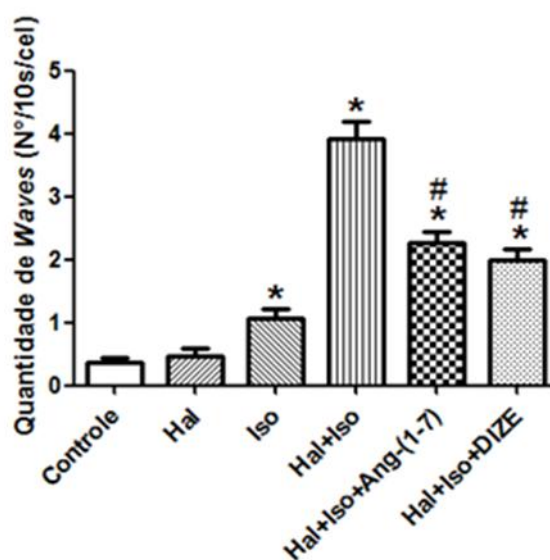


Figura 33: Efeitos da Ang-(1-7) e do DIZE na quantidade de *waves* de cálcio. Figura representativa das *waves* após o transiente de cálcio (A: controle; B: halotano; C: isoproterenol; D: halotano + isoproterenol; E: halotano + isoproterenol + Ang-(1-7); F: halotano + isoproterenol + DIZE) (painel superior). O gráfico mostra que a Ang-(1-7) e o DIZE reduziram significativamente a quantidade de *waves*. Hal: halotano; Iso: isoproterenol (painel inferior). Controle (n=92); Hal (n=37); Iso (n=41); Hal+Iso (n=75); Hal+Iso+Ang-(1-7) (n=69); Hal+Iso+DIZE (n=76). Resultados expressos como média \pm E.P.M (* $p < 0,05$ em relação ao grupo controle; # $p < 0,05$ em relação ao grupo Hal+Iso. *One-way* ANOVA seguido pelo pós-teste de *Newman-Keuls*).

Analisando a amplitude do transiente de cálcio (F/F_0) no citoplasma, nós observamos que apenas o isoproterenol aumentou de forma significativa esse parâmetro (Controle: $3,0 \pm 0,1$; Hal: $3,3 \pm 0,1$; Iso: $4,0 \pm 0,2$; Hal+Iso: $3,1 \pm 0,1$; Hal+Iso+Ang-(1-7): $3,0 \pm 0,1$ e Hal+Iso+DIZE: $3,2 \pm 0,1$). Entretanto, o decaimento da fluorescência, que determina a recaptação do cálcio, aumentou significativamente nos grupos isoproterenol, halotano + isoproterenol e halotano + isoproterenol + Ang-(1-7) (Controle: $225,6 \pm 11,6$; Hal: $208,6 \pm 15,5$; Iso: $148,1 \pm 11,9$; Hal+Iso: $171,9 \pm 15,8$; Hal+Iso+Ang-(1-7): $170,7 \pm 10,9$ e Hal+Iso+DIZE: $216,9 \pm 20,9$ ms) (**Figura 34**).

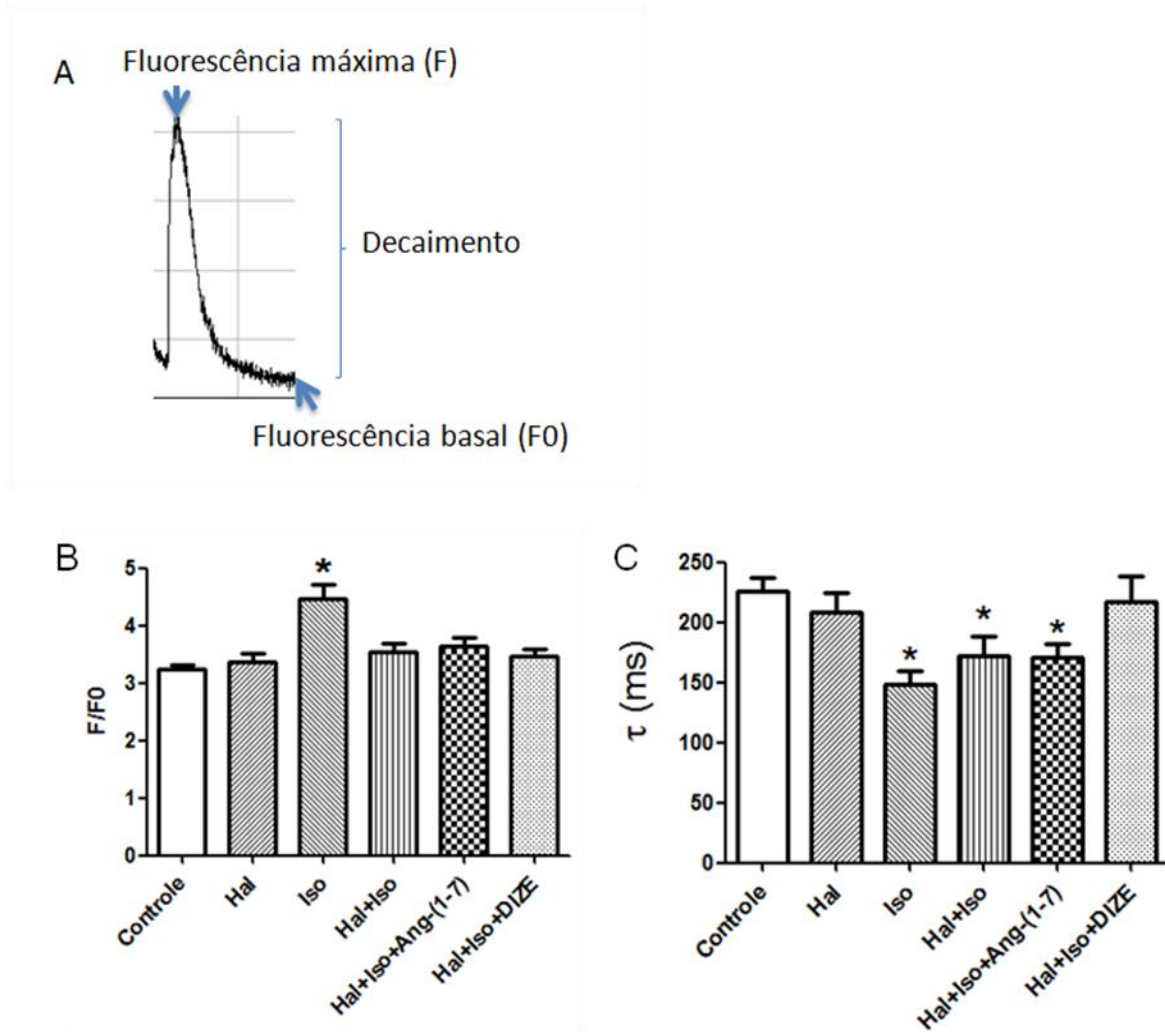


Figura 34: Efeitos da Ang-(1-7) e do DIZE no manejo de cálcio. (A) Figura representativa do traçado do transiente de cálcio. O ponto mais superior do traçado é o instante no qual se considera a intensidade máxima de fluorescência (F). O ponto mais inferior é considerado o *background* de fluorescência (F0), sendo que a razão entre esses dois pontos corresponde a variação global de Ca^{+2} (F/F0). Assim, a curva representa a amplitude do transiente de cálcio e o decaimento da recaptção de Ca^{+2} (melhor ajuste monoexponencial). (B) F/F0; e (C): decaimento da recaptção de Ca^{+2} . Hal: halotano; Iso: isoproterenol. Controle (n=92); Hal (n=37); Iso (n=41); Hal+Iso (n=75); Hal+Iso+Ang-(1-7) (n=69); Hal+Iso+DIZE (n=76). Resultados expressos como média \pm E.P.M (* $p < 0,05$ em relação ao grupo controle. *One-way ANOVA* seguido pelo pós-teste de *Newman-Keuls*).

6- DISCUSSÃO

Nosso modelo experimental para a indução das arritmias já está bem consolidado na literatura (Miletich et al, 1978; Weigth et al, 1998; Kawai et al, 2002; Kagawa, et al 2005). Brevemente, em relação ao modelo de arritmias cardíacas *in vivo* utilizado nesse estudo, ele é baseado no fato do halotano alterar a velocidade de condução intraventricular do impulso e na potencialização desse efeito pela adrenalina (Takada et al, 1993). A adrenalina sintética injetada é um composto simpatomimético, ou seja, ela é capaz de reproduz os efeitos provocados pela estimulação dos nervos simpáticos. Quando injetada em altas concentrações ela pode provocar aumento do ritmo e débito cardíaco, do consumo de oxigênio e também irritabilidade das células NSA (principalmente quando sua injeção está associada a anestésicos como o halotano). Anestésicos voláteis podem afetar diretamente as correntes iônicas diminuindo a condução do impulso o que pode desencadear alterações no ritmo cardíaco (Weigth et al, 1998). O halotano é tradicionalmente considerado como pró-arrítmico predispondo o coração á arritmias ventriculares (Teixeira-Neto et al, 2000). Possivelmente, ele age como um detergente alterando a fluidez e expansão da membrana plasmática o que pode gerar desestabilização do potencial de membrana dos cardiomiócitos resultando em arritmias (Miletich et al, 1978).

Desde a sua descoberta, a Ang-(1-7) se tornou alvo de diversas pesquisas na área de fisiologia cardiovascular e vários estudos mostram os efeitos cardioprotetores desse peptídeo (Ferreira et al, 2001; Gembardt el at, 2003; Santos et al, 2004; Castro et al, 2006). Nesse trabalho observamos que a Ang-(1-7) apresenta atividade antiarrítmica *in vivo*. Esse efeito ocorreu de forma aguda após a injeção desse peptídeo na veia jugular de ratos nos quais foram induzidos eventos arrítmicos. Além disso, ele foi bifásico, sendo que a concentração que provocou uma significativa redução das arritmias foi a de 4 nM. Esse efeito bifásico da Ang-(1-7) também já foi observado em outros estudos. Por exemplo, foi demonstrado que a Ang-(1-7), em concentrações maiores, é capaz de facilitar as arritmias de reperfusão (Neves et al, 1997) e camundongos transgênicos que superexpressam a ECA2, o que possibilitaria um aumento nos níveis de Ang-(1-7), morrem em decorrência de arritmias cardíacas (Donoghue et al 2003). Esses dados corroboram com os nossos resultados que mostram um efeito arrítmico da Ang-(1-7) em concentrações maiores. É importante ressaltar que a concentração fisiológica de Ang-(1-

7) na circulação sanguínea é de aproximadamente 20 pg/mL (McKinney et al, 2014). Alguns autores sugerem que concentrações suprafisiológicas, na ordem de micromolar, de Ang-(1-7) são capazes de ativar o receptor AT₁ (Brosnihan et al, 1996, Bosnyak et al, 2012).

Em concordância com a literatura, o efeito antiarrítmico provocado pela administração da Ang-(1-7) ocorreu via ativação do Mas (Santos et al, 2003), uma vez que a presença do antagonista seletivo desse receptor, o A-779, foi capaz de bloquear o efeito antiarrítmico da Ang-(1-7). Além da ativação do receptor Mas, a ação antiarritmogênica da Ang-(1-7) está relacionada com a liberação de NO. Já foi demonstrado que a Ang-(1-7) via Mas ativa a proteína fosfatidilinositol 3-quinase B o que leva a ativação da proteína quinase B (Akt) com consequente fosforilação da enzima óxido nítrico sintase determinando a geração de NO em cardiomiócitos ventriculares (Dias-Peixoto et al 2008). De fato, cardiomiócitos ventriculares isolados tratados com Ang-(1-7) apresentam produção significativa de NO (Gomes et al, 2010). A injeção de Ang-(1-7) na veia jugular de ratos hipertensos promoveu um aumento na produção de NO no coração (Costa et al, 2010) e cultura de células endoteliais incubadas com a Ang-(1-7) apresentaram produção significativa de NO após 5 min do estímulo sendo que a fosforilação e ativação da Akt ocorreu 1 min após a incubação com a Ang-(1-7) (Sampaio et al, 2007b).

De acordo com esses dados, utilizando o L-NAME, nós demonstramos que o NO está envolvido nos efeitos antiarrítmicos *in vivo* da Ang-(1-7). Com o bloqueio dessa enzima a quantidade de eventos arrítmicos permaneceu alta o que evidencia que o NO é importante para a redução das arritmias. É importante ressaltar que a manutenção dos níveis basais de NO é crucial, pois a injeção apenas de L-NAME deixou os animais mais propensos ao desenvolvimento de arritmias. De fato, já foi demonstrado que o NO participa de efeitos antiarrítmicos durante eventos de isquemia e reperfusão (Kisvari et al, 2014). Estudos *in vivo* utilizando corações de cães e porcos mostraram uma diminuição da produção de NO durante a oclusão de artéria coronária. Essa redução na quantidade de NO contribuiu para o desenvolvimento de arritmias ventriculares fatais, indicando que a manutenção da síntese de NO pelas enzimas endógenas ou através da administração de compostos doadores de NO pode gerar uma cardioproteção (Kiss et al, 2010). O efeito cardioprotetor do NO é mediado por uma série de eventos, por exemplo, atenuação do

stress oxidativo no miocárdio via diminuição da produção de superóxido (inibindo as enzimas xantina oxidase e xantina desidrogenase que geram os superóxidos). O NO também atua diretamente na função mitocondrial, uma vez que ele pode interagir com a cadeia transportadora de elétrons e proteínas desacopladoras diminuindo a produção de superóxido por essa organela (Burwell e Brookes, 2008; Kiss et al, 2010). Além disso, o NO pode promover diminuição da severidade das arritmias via ação direta em junções comunicantes (*GAP junctions*) ou em canais iônicos promovendo aumento intracelular de GMPc e diminuição do transiente de cálcio (Gonczi et al, 2009). O NO também participa do controle da contratilidade do coração e da FC, contribui para o remodelamento cardíaco após infarto e protege contra isquemia, além de modular o sistema nervoso simpático (Rastaldo et al, 2007). Já se sabe que esse gás pode ser produzido por três isoformas de enzimas via conversão de L-arginina em L-citrulina: óxido nítrico sintase endotelial (eNOS), neuronal (nNOS) ou induzida (iNOS), sendo que essas três isoformas são expressas em corações de mamíferos (Rastaldo et al, 2007). A inibição da nNOS e da eNOS, encontradas tipicamente associadas à membrana do RS e das cavéolas do coração, provoca diminuição da contração cardíaca e do transiente de cálcio, o que mostra a existência de uma sinalização via NO que é essencial para a transdução de sinais cardíacos (Jian et al, 2014). Já existem evidências que o NO apresenta efeitos antiarrítmicos em modelos animais e em humanos (Burger & Feng, 2011), porém os mecanismos específicos de sua ação ainda não estão completamente esclarecidos.

A atividade cardioprotetora da Ang-(1-7) também pode ser explicada de forma indireta por meio da potenciação dos efeitos da bradicinina (BK) (Paula et al, 1995; Almeida et al, 2000) ou através do antagonismo dos efeitos deletérios da Ang II (Santos et al, 2000). Considerando a potenciação dos efeitos da BK, já se sabe que existe uma interdependência entre o SRA e o sistema caliceína-cinina (SCC). Esse último sistema está envolvido na regulação da pressão arterial, inflamação, homeostase cardiovascular, respostas analgésicas, proliferação celular e liberação de citocinas (Naffah-Mazzacoratti et al, 2014). Um dos principais produtos do SCC é a BK que no sistema cardiovascular apresenta ação vasodilatadora estimulando a liberação de NO. Estudos já mostraram que a Ang-(1-7) não só atua como substrato para ECA, mas também inibe essa enzima (Paula et al, 1995; Almeida et al, 2000). Por sua vez, a ECA também degrada a BK. Assim, se a ECA for inibida, a degradação da BK diminui potencializando seus efeitos (Su JB, 2013).

Existe então, um *cross-talk* entre o SRA e o SCC o que pode ajudar a explicar os efeitos benéficos da Ang-(1-7), como por exemplo, através da inibição da ECA e diminuição da degradação da BK no coração.

É importante destacar que a Ang-(1-7) não provocou alterações na PAM e na FC, indicando que os efeitos antiarrítmicos desse peptídeo foram independentes de mudanças em parâmetros hemodinâmicos. O aumento da PAM observada nos grupos adrenalina e adrenalina + Ang-(1-7) pode ser atribuído a injeção da adrenalina sintética que é um composto simpatomimético, ou seja, capaz de reproduz os efeitos provocados pela estimulação dos nervos simpáticos. Considerando os parâmetros hemodinâmicos, a adrenalina quando injetada intravenosamente desencadeia aumento da resistência vascular periférica causando aumento da PAM (Teixeira-Neto et al, 2001).

O DIZE é um composto utilizado para o tratamento da tripanossomíase e leishmaniose animais, pois ele impede a replicação do DNA e a atividade mitocondrial dos patógenos causadores dessas doenças (Hwang et al, 2010; Stewart et al, 2010; Kuriakose & Jude, 2014). Considerando os estudos sobre o SRA, já foi demonstrado que esse composto é capaz de ativar a ECA2 (Kulemina & Ostrov, 2011; Kuriakose & Jude, 2014). O DIZE quando administrado 2 dias antes da indução de isquemia do miocárdio em ratos aumenta a atividade da ECA2 e é capaz de promover a diminuição de áreas de infarto, aumentando o número de células progenitoras cardíacas e modulando a produção de citocinas pró-inflamatórias (Qui et al, 2013). Ele afeta o sistema imune diminuindo a produção de citocinas pró-inflamatórias como as interleucinas 6 e 12 e o fator de necrose tumoral (TNF- α) (Kuriakose & Jude, 2014), o que sugere que o DIZE é um composto que tem efeito anti-inflamatório. Em nosso trabalho foi demonstrado que o DIZE apresenta um evidente efeito antiarrítmico. Contudo, ao contrário do que esperávamos esse efeito foi extremamente agudo, ou seja, assim que o DIZE foi injetado os ratos não apresentavam mais eventos arrítmicos ou, quando tinham, esses eventos eram esporádicos. Assim, acreditamos que não havia tempo suficiente para o DIZE ativar a ECA2 e estimular a produção de Ang-(1-7). Dessa forma, é possível que essa resposta imediata provocada pelo DIZE não esteja totalmente associada à produção de Ang-(1-7), mas ao contrário, esse composto poderia interagir diretamente com fatores ou estruturas celulares ainda não identificadas, modulando o desencadeamento de arritmias. De fato, já foi descrito que a ECA2 atua também como receptor de alguns vírus como o vírus Sars-

CoV causador da Síndrome Respiratória Aguda Grave (Clarke & Turner, 2012). Além disso, estruturalmente a ECA2 pode ser entendida como uma quimera, apresentando homologia na região catalítica com a ECA e na região transmembrana com a colectrina que é uma chaperona molecular (Clarke & Turner, 2012). Essas características mostram que a ECA2 apresenta potencial para desencadear outras funções biológicas adicionais, as quais poderiam ser moduladas pelo DIZE reduzindo as arritmias. É importante considerar que o DIZE apresenta rápida absorção e pode atravessar a membrana plasmática das células via difusão simples (Kuriakose & Uzonna, 2014), o que corrobora ainda mais com o rápido curso temporal em reduzir as arritmias cardíacas. Porém, ainda são necessários outros experimentos para a elucidação de como o DIZE e a ECA2 interagem e se eles realmente interagem em nosso modelo. Apesar disso, os nossos dados permitem concluir que o DIZE pode atuar de forma aguda e sua ação não é bloqueada pelo A-779, o que mostra uma independência da ativação do Mas. Além disso, o NO não participa dos efeitos do DIZE, pois houve uma redução significativa das arritmias mesmo com a administração de L-NAME precedente à administração do DIZE.

Uma vez demonstrado o grande potencial antiarrítmico *in vivo* da Ang-(1-7) e do DIZE, nós resolvemos investigar como os cardiomiócitos isolados reagiriam em um modelo similar ao utilizado *in vivo* (agonista adrenérgico associado ao anestésico halotano), focando na contratilidade, excitabilidade e manejo intracelular de cálcio. É importante ressaltar que nos experimentos a nível celular foram necessárias três modificações em relação ao modelo de experimentação *in vivo*: 1) O uso do isoproterenol como agonista adrenérgico em substituição à adrenalina. Essa alteração foi realizada com o objetivo de estudar de maneira mais específica o efeito da estimulação simpática nos cardiomiócitos isolados, uma vez que a estimulação beta-adrenérgica é responsável pelos efeitos inotrópicos, lusitrópicos e cronotrópicos no coração (Bers, 2001). 2) O uso do halotano solubilizado na concentração de 0,9 mM que, de acordo com a literatura, equivale a inalação de halotano 1,5% (Eskinder et al, 1991). 3) O uso de camundongos como modelo animal de experimentação. Essa alteração foi feita com base na observação de que a preparação de células ventriculares de ratos é muito mais susceptível ao desenvolvimento de alterações celulares mesmo na ausência da administração de qualquer substância, o que comprometia a avaliação dos resultados.

A partir dos experimentos de contratilidade celular, verificamos um efeito agudo da Ang-(1-7) e do DIZE. Isso porque logo após a perfusão desses compostos houve redução do número de eventos arritmogênicos por minuto, por célula. Também houve redução na proporção de células que desencadearam arritmias (presença de contrações espontâneas desencadeadas sem estimulação prévia). Esses dados estão de acordo com os resultados obtidos *in vivo*.

É importante destacar que, aparentemente, o aumento dos parâmetros contráteis dos cardiomiócitos está relacionado com a administração do isoproterenol, uma vez que ele é um agonista beta-adrenérgico. Com exceção dos efeitos do DIZE na taxa máxima de contração e de relaxamento, o halotano, a Ang-(1-7) e o DIZE não interferiram nos efeitos do isoproterenol. A ativação dessa via nos cardiomiócitos induz a produção de AMPc através da adenilato ciclase. O aumento na concentração de AMPc induz a ativação da proteína quinase A (PKA) que, por sua vez, provoca a fosforilação de diversos componentes envolvidos no acoplamento excitação-contração e desencadeia o aumento nas respostas inotrópicas e lusitrópicas observadas pela estimulação adrenérgica. Especificamente, ocorre a fosforilação dos RyRs aumentando sua probabilidade de abertura (Bers 2001), que em conjunto com a fosforilação do canal para cálcio Cav1.2, induz um aumento na amplitude do transiente de cálcio citoplasmático. Além disso, a PKA fosforila a fosfolambam, removendo a inibição da Ca^{+2} -ATPase do RS (SERCA) e conferindo um efeito lusitrópico positivo. Assim, mesmo com a perfusão da Ang-(1-7) e do DIZE o aumento na fração de encurtamento e o efeito lusitrópico positivo foram mantidos, sugerindo que esses compostos atuam reduzindo a propensão celular à arritmia sem alterar a sinalização beta-adrenérgica induzida pelo isoproterenol. É importante ressaltar que muitos medicamentos antiarrítmicos disponíveis na clínica provocam uma melhora do quadro de arritmia mas, podem causar redução da força de contração, sendo dessa forma contra indicados para pacientes que também apresentem insuficiência cardíaca.

Considerando a derivada da taxa máxima (dL/dt) de contração e de relaxamento, foi observado um aumento em relação ao controle em todos os grupos que foram perfundidos com o isoproterenol. Mais uma vez, isso mostra que esse evento está relacionado à cinética de ligação e desligamento do cálcio aos miofilamentos, a qual é drasticamente alterada pela ativação da via adrenérgica pelo isoproterenol. Entretanto, é

importante notar que o DIZE ainda promoveu um aumento adicional nesses parâmetros, fato que ainda não sabemos explicar.

Analisando a excitabilidade dos cardiomiócitos através dos experimentos de *patch clamp* demonstramos que após a administração de Ang-(1-7) ou DIZE houve hiperpolarização do potencial de repouso e redução da fase de repolarização do PA. Considerando a hiperpolarização do potencial de repouso, é importante mencionar que esse evento pode representar um efeito antiarritmogênico. Isso porque quanto menor o potencial de repouso, mais difícil será para atingir o limiar de excitação e desencadear um evento de despolarização arritmico. Já o encurtamento do PA (provocado pela redução da fase de repolarização) pode ser cardioprotetor. No nosso caso, um PA mais curto diminui a chance de ocorrência de eventos de pós-despolarização. São conhecidos dois tipos de pós-despolarização: precoce (PDP) e tardia (PDT) (Berne & Levy, 2009). Geralmente, as PDP e PDT aparecem no final do platô do PA ou durante a fase de repolarização e tendem a ocorrer com maior probabilidade em células cardíacas com PA prolongado. Por isso, uma diminuição da fase de repolarização do PA pode contribuir para o não aparecimento desses eventos que são pró-arrítmicos.

É importante considerar que tanto a PDP como a PDT estão relacionadas com o íon Ca^{+2} . Por exemplo, quando o PA está prolongado, os canais para Ca^{+2} que foram ativados no início do platô têm tempo suficiente de se restabelecerem da inativação e, assim, podem ser reativados antes que a célula seja totalmente repolarizada. Essa ativação secundária desses canais poderia deflagrar uma PDP, promovendo a entrada de cálcio adicional que irá ativar os RyRs liberando mais cálcio para o citoplasma e desencadeado uma contração prematura. Já a PDT está associada com uma elevada concentração intracelular de Ca^{+2} . Uma maior concentração de cálcio no citoplasma pode, por exemplo, ativar o trocador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{+2}$. Esse trocador é eletrogênico e gera uma corrente despolarizante na célula quando funcionando em seu modo normal, uma vez que transfere 3 íons Na^+ para dentro da célula para cada íon Ca^{+2} que ejeta. Isso acaba criando uma corrente de Na^+ que contribui para o aparecimento da PDT. Outros mecanismos associados com a redução do cálcio citoplasmático são: a SERCA, a Ca^{+2} -ATPase sarcolemal (PMCA) e o uniporte mitocondrial de Ca^{+2} (Bers 2001).

Ao analisarmos o PA dos cardiomiócitos a 50% da fase de repolarização, observamos que a associação do halotano com isoproterenol provocou um aumento significativo desse parâmetro. Esses dados estão em concordância com achados prévios que mostraram uma redução de diversos tipos de correntes de potássio induzida pelo halotano (Eskinder et al, 1991) em associação com o aumento na corrente de cálcio induzido pelo isoproterenol (Bers 2001), o que em conjunto aumenta a duração da fase de platô. Entretanto, ao analisarmos o tempo para 50% da repolarização na presença da Ang-(1-7) e do DIZE foram obtidos valores semelhantes aos do controle. Esse fenômeno sugere uma modulação dos canais para potássio e/ou cálcio por essas moléculas de modo a normalizar a densidade de corrente dos cardiomiócitos conferindo cardioproteção. É importante nesse ponto ressaltar o papel da Ang-(1-7) na produção de NO, uma vez que essa molécula, via ativação de produção de GMPc através da guanilato ciclase, pode induzir a fosforilação do Cav1.2 (Massion et al 2003), importante canal relacionado com a entrada de cálcio na célula que quando fosforilado pode reduzir o influxo desse íon. Interessantemente, esses compostos isolados (halotano e isoproterenol) não foram capazes de provocar alterações significativas no tempo para repolarização do PA a 50% quando comparado ao controle. Com esses experimentos podemos sugerir que a Ang-(1-7) e o DIZE preveniram o influxo excessivo de Ca^{+2} via canal de cálcio do tipo L (LTCC) cuja atividade estava aumentada pela estimulação adrenérgica, regulando, assim, a ativação dos RyRs e liberação de cálcio (utilizado para a contração) pelo RS.

Foi observado também um prolongamento do PA a 10% da repolarização de forma semelhante à 50%. Isso pode ser explicado pelos mesmos motivos citados acima. Além disso, o isoproterenol pode não apenas ter provocado aumento na atividade dos LTCC, mas também pode ter mudado a sua dependência de voltagem para ativação e inativação (Bers, 2001). Dessa forma, a ativação deslocada para potenciais mais negativos pelo isoproterenol em conjunto com o bloqueio das correntes de potássio pelo halotano, podem justificar o aumento na duração dessa fase do PA. Em relação ao encurtamento provocado pelo DIZE e Ang-(1-7), os mesmos mecanismos discutidos para 50% da repolarização podem ser aplicados.

Ainda em relação à excitabilidade das células cardíacas, não observamos nenhuma alteração significativa na amplitude do PA (exceto no grupo isoproterenol). Apesar disso, observamos, em todos os grupos administrados com halotano, uma redução na taxa

máxima de despolarização do PA (dV/dt), o que sugere um bloqueio pelo halotano dos canais para sódio Nav1.5, como já descrito na literatura (Weigth et al, 1998). Além disso, nem o DIZE nem a Ang-(1-7) foram capazes de reverter esse fenômeno. Isso sugere que esses compostos não interferem nas correntes de sódio bloqueadas pelo halotano, ou seja, esse não é um mecanismo de ação do DIZE ou da Ang-(1-7), uma vez que eles não foram capazes de reverter esse bloqueio. Entretanto, esses dados não nos permite excluir a possibilidade do DIZE e da Ang-(1-7) impedirem a atuação do halotano na célula por outros mecanismos.

Com os experimentos de microscopia confocal observamos a participação fundamental do cálcio intracelular nos nossos resultados. Considerando as *waves* (ondas de cálcio no citoplasma desencadeadas por uma reativação em cadeia dos RyR que acontece de maneira assíncrona e iniciada pelo cálcio), foi observada uma redução significativa com a incubação de Ang-(1-7) e DIZE. Se analisarmos o transiente, podemos observar que o isoproterenol, pela ativação da via beta-adrenérgica, induziu um aumento na amplitude da onda de cálcio (F/F_0). Isso está relacionado com a alteração provocada por esse composto na liberação do cálcio (via fosforilação dos RyR, aumentando sua probabilidade de abertura) e também com o aumento desse íon no RS (relacionado com o aumento na taxa de recaptção via SERCA). Além disso, o halotano vem sendo caracterizado por interagir com membranas, o que pode implicar na desestabilização das estruturas associadas a elas. Assim a partir dos nossos resultados, podemos inferir que os mecanismos envolvidos na geração das arritmias em nosso modelo foram a ativação beta-adrenérgica associada à presença do halotano gerando um aumento na probabilidade de abertura dos RyR e propiciando um vazamento muito grande de cálcio do RS, o que desencadeia a geração de *sparks* de cálcio durante o período diastólico favorecendo o aparecimento das *waves* de cálcio. Esse fenômeno é altamente favorecido pelo aumento da corrente de cálcio via LTCC induzido pelo isoproterenol, o que associado à alta taxa de recaptção de cálcio para o retículo pela SERCA (induzida pela remoção da inibição do fosfolambam após a estimulação adrenérgica) permite a manutenção de uma concentração elevada de cálcio no retículo, novamente favorecendo a ocorrência de *sparks* e *waves* de cálcio.

Além disso, existem relatos de que a administração de halotano reduz a atividade do trocador Na^+/Ca^{+2} (Weigth et al, 1998) e, dessa forma, induz um desbalanço na

concentração de cálcio que entra e sai via trocador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{+2}$, elevando ainda mais o conteúdo de cálcio do SR. No entanto, é importante lembrar que a amplitude do transiente é uma medida da relação F/F_0 e, em nosso modelo, a concentração diastólica de cálcio deve estar muito elevada pelo vazamento de cálcio e/ou pela redução na atividade do trocador descrita acima. Esses processos podem justificar a presença de um transiente nas células incubadas com halotano+isoproterenol de uma amplitude semelhante às células controle, considerando que a concentração de cálcio sistólico esteja bastante elevada nessas células. Esse modelo está de acordo com os dados da contratilidade celular, em que o aumento na fração de encurtamento está em concordância com uma maior concentração sistólica de cálcio, assim como a maior velocidade de relaxamento está em concordância com a maior atividade da SERCA em conjunto com a diminuição da sensibilidade dos miofilamentos causada pela estimulação adrenérgica. De forma complementar, o prolongamento do PA observado a 50% da repolarização ainda pode ter contribuído para a geração de PDP, agravando ainda mais a arritmogênese associada ao modelo.

É sabido que a ativação do Mas pela Ang-(1-7) gera a liberação de NO em cardiomiócitos (Gomes et al, 2010). Entretanto, os estudos relacionando o papel do NO no acoplamento excitação-contração são controversos e dependem da concentração de NO produzido, do local de produção e da comunicação com outras vias (Lim et al, 2008). Esse fato é parcialmente justificado pela diversidade de moléculas que podem sofrer modificações pós-traducionais diretamente via nitrosilação (Massion et al 2003; Lim et al, 2008), além de vias bioquímicas engatilhadas pela produção dessa molécula. Nesse contexto, podemos citar a produção de GMPc que, ao ativar a PKG, pode induzir a fosforilação do canal de cálcio (Massion et al 2003; Hidalgo et al 2005), reduzindo a corrente e com isso induzindo uma redução no transiente de cálcio, o que pode justificar o efeito da Ang-(1-7) na redução desse parâmetro para níveis semelhantes ao controle em nosso trabalho.

Diversos estudos demonstram uma atividade bifásica do NO. Em geral, concentrações baixas geram efeito inotrópico positivo e concentrações altas, negativo (Kelly et al, 1996; Massion et al 2003). No nosso modelo, observamos de forma semelhante um efeito bifásico da Ang-(1-7), o que pode ser parcialmente justificado pela produção exacerbada de NO e/ou pela capacidade da Ang-(1-7) ativar o receptor AT_1 em

altas concentrações (Brosnihan et al, 1996, Bosnyak et al, 2012). Dessa forma, a produção de NO em nosso modelo pode justificar o efeito lusitrópico positivo, mesmo considerando os relatos de que a presença de NO pode induzir, via PKG, a atenuação da resposta de PKA pela ativação de fosfodiesterases (Massion et al 2003). De forma ainda mais complexa, os efeitos do NO dependem do nível de ativação beta-adrenérgica, ou seja, em condições de ativação sub-máxima o NO atua aumentando a probabilidade de abertura dos RyR, enquanto em condições de alta ativação beta-adrenérgica, como no nosso modelo, o NO atua diminuindo a probabilidade de abertura desses receptores e, com isso, prevenindo o vazamento de cálcio do retículo e por conseguinte as arritmias (Ziolo et al, 2001). Assim, podemos pensar que a Ang-(1-7) reduz o vazamento de cálcio do retículo diante de um modelo de alta estimulação beta-adrenérgica, mantendo os efeitos inotrópicos e lusitrópicos positivos, porém regularizando a liberação de cálcio do retículo e modificando o PA, promovendo seu encurtamento e hiperpolarização do potencial de repouso do cardiomiócito. Esse conjunto de fatores propicia a proteção observada contra o desenvolvimento de arritmias ventriculares a nível celular.

Nosso trabalho também demonstrou a proteção contra arritmias desencadeada pelo DIZE de forma aguda e independente da ativação do Mas. Tal fenômeno teve a mesma magnitude ou até mesmo maior do que a desencadeada pela Ang-(1-7). Entretanto, esse processo não dependeu da produção de NO, como demonstrado utilizando o L-NAME, onde a proteção contra arritmias ainda era mantida. Muitos são os mecanismos que podem estar envolvidos na atuação do DIZE abolindo o aparecimento das arritmias. Em nosso trabalho mostramos que tal composto foi capaz de reduzir o aparecimento das *waves* de cálcio, além de regularizar a amplitude e decaimento do transiente de cálcio para valores próximos aos da situação controle, sendo que os efeitos inotrópico e lusitrópico positivos típicos da estimulação beta-adrenérgica foram mantidos. Diversas moléculas e vias estão envolvidas na modulação do acoplamento excitação-contração. A produção de espécies reativas de oxigênio por diversas enzimas e a modulação alfa-adrenérgica culminando com a ativação de PKC e fosfatidilinositol trifosfato (IP3) são exemplos de mecanismos capazes de modular o manejo citoplasmático de cálcio. Ainda não podemos nos esquecer das proteínas calmodulina e calmodulina quinase, que regulam a atividade de diversos componentes envolvidos no processo. Até o presente momento, não é possível determinar o mecanismo pelo qual o

DIZE provoca redução das arritmias e, outros estudos precisam ser realizados nesse sentido.

7- CONCLUSÕES

Com esse trabalho nós podemos concluir que a Ang-(1-7) reduz as arritmias *in vivo* via receptor Mas, com participação de NO e sem alteração nos parâmetros hemodinâmicos. O DIZE também apresenta ação antiarrítmica, porém, essa ação é independente do Mas e do NO. Ambos os compostos reduzem as arritmias celulares, sem provocar redução na fração de encurtamento e nas velocidades de contração e relaxamento provocadas pela estimulação adrenérgica. Isso indica um efeito antiarrítmico sem alteração da força de contração. Além disso, a Ang-(1-7) e o DIZE promovem um encurtamento do PA e hiperpolarização do potencial de membrana, fatores que também podem atuar como preventivos no nosso modelo de arritmia. Essa redução na quantidade de arritmias celulares foi acompanhada por uma redução na frequência das *waves* de cálcio, sem alteração da amplitude do transiente. Apenas a Ang-(1-7) diminui o decaimento, indicando elevada taxa de recaptação desse íon via SERCA, induzida pela ativação beta-adrenérgica, enquanto o DIZE determinou uma lentificação na recaptação para níveis semelhantes aos do controle. Todos esses dados sugerem que a Ang-(1-7) e também o DIZE podem ser úteis no tratamento de síndromes arritmogênicas que levam à morte súbita.

8- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Al Chekatie, MO. Traditional Heart Failure Medications and Sudden Cardiac Death Prevention: A Review. *J Cardiovasc Pharmacol Ther* 2013;00(0):1-15.

Alenina N, Xu P, Rentzsch B, Patkin EL, Bader M. Genetically altered animal models for Mas and angiotensin-(1-7). *Exp Physiol* 2008;93:528-537.

Almeida AP, Frábregas BC, Madureira MM, Santos RJS, Campagnole-Santos MJ, Santos RAS. Angiotensin-(1-7) potentiates the coronary vasodilatory effect of bradykinin in the isolated rat heart. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* 2000;33:709-713.

Bers DM. Inotropic mechanisms in cardiac muscle *Heart Physiology and Pathophysiology*. 4^o ed. 2001.

Berne RM, Levy MN, Koeppen BM, Stanton BA. *Fisiologia*. 6^a ed. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan, 2009.

Bosnyak S, Widdop RE, Denton KM, et al. Differential mechanisms of Ang (1-7)-mediated vasodepressor effect in adult and aged candesartan-treated rats. *Int J Hypertens* 2012;192567.

Burger DE, Feng Q. Protective role of nitric oxide against cardiac arrhythmia - an update. *Open Nitric Oxide J*;2011(3):38-47.

Brosnihan KB, Li P, Ferrario CM. Angiotensin-(1-7) dilates canine coronary arteries through kinins and nitric oxide. *Hypertension*. 1996;27(3):523-528.

Burrell LM, Risvanis J, Kubota E, Dean RG, MacDonald PS, Lu S, Tikellis C, Grant SL, Lew RA, Smith AI, Cooper ME, Johnston CI. Myocardial infarction increases ACE2 expression in rat and humans. *Eur Heart J* 2005;26:369-375.

Burwell LS, Brookes PS. Mitochondria as a target for the cardioprotective effects of nitric oxide in ischemia-reperfusion injury. *Antioxid Redox Signal* 2008;10:579-599.

Castro CH, Santos RA, Ferreira AJ, Bader M, Alenina N, Almeida AP. Effects of genetic deletion of angiotensin-(1-7) receptor Mas on cardiac function during ischemia/reperfusion in the isolated perfused mouse heart. *Life Sci* 2006;80:264-268.

Clarke NE, Turner AJ. Angiotensin-converting enzyme 2: the first decade. *Int J Hypertens* 2012;307315.

Clayton JS, Clark KL, Jonhs EJ, Drew GM. Effects of prostaglandins and nitric oxide on the renal effects of angiotensin II in the anaesthetized rat. *Br J Pharmacol* 1998;124:1467-1464.

Conde-Garcia EA. *Biofísica*. São Paulo: Savier, 1998.

Costa MA, Lopez Verrilli MA, Gomez KA, Nakagawa P, Pena C, Arranz C, et al. Angiotensin-(1-7) upregulates cardiac nitric oxide synthase in spontaneously hypertensive rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2010;299:1205-1211.

Coutinho DCO, Foureaux G, Rodrigues KDL, Salles RLA, Moraes PL, Murça TM, et al. Cardiovascular effects of angiotensin A: A novel peptide of the renin-angiotensin system. *J Renin Angiotensin Aldosterone Syst* 2013;0(0):1-7.

Cumming DV, Heads RJ, Brand NJ, et al. The ability of heat stress and metabolic preconditioning to protect primary rat cardiac myocytes. *Basic Res Cardiol* 1996;91:79-85.

Dempsey P, McCallum Z, Kent K, Cooper T. Direct myocardial effects of angiotensin II. *Am J Physiol* 1971;220:477-481.

Dias-Peixoto MF, Santos RA, Gomes ER, Alves MN, Almeida PW, Greco L, et al. Molecular mechanisms involved in the angiotensin-(1-7)/Mas signaling pathway in cardiomyocytes. *Hypertension*. 2008;52:542-548.

Dilauro M, Burns KD. Angiotensin-(1-7) and its effects in the kidney. *ScientificWorldJournal* 2009;9:522-535.

Donoghue M, Wakimoto H, Maguire CT, Acton S, Hales P, Stagliano N, et al. Heart block, ventricular tachycardia, and sudden death in ACE2 transgenic mice with downregulated connexins. *J Mol Cell Cardiol* 2003;35:1043-1053.

Eskinder H, Rusch NJ, Supan FD, Kampine JP, Bosnjak ZJ. The effects of volatile anaesthetics on L- and T- type calcium channel currents in canine cardiac Purkinje cells. *Anesthesiology*. 1991;74:919-926.

Fabiato A e Fabiato F. Calcium and cardiac excitation-contraction coupling. *Annu Rev Physiol*. 1979;41:473-84.

Faria-Silva R, Duarte FV, Santos RA. Short-term angiotensin-(1-7) receptor MAS stimulation improves endothelial function in normotensive rats. *Hypertension*. 2005;46:948-952.

Ferrario CM, Chappell MC, Dean RH, Iyer SN. Novel angiotensin peptides regulate blood pressure, endothelial function, and natriuresis. *J Am Soc Nephrol*.1998;9:1716-1722.

Ferrario CM. New physiological concepts of the renin-angiotensin system from the investigation of precursors and products of angiotensin I metabolism. *Hypertension*. 2010;55:445-452.

Ferreira AJ, Santos RA, Almeida AP. Angiotensin-(1-7): cardioprotective effect in myocardial ischemia/reperfusion. *Hypertension* 2001;38(3):665-668.

Ferreira AJ, Santos RA. Cardiovascular actions of angiotensin-(1-7). *Braz J Med Biol Res* 2005;38(4):499-507.

Ferreira AJ, Shenoy V, Qi Y, Fraga-Silva RA, Santos RA, Katovich MJ, Raizada MK. Angiotensin-converting enzyme 2 activation protects against hypertension-induced cardiac fibrosis involving extracellular signal-regulated kinases. *Exp Physiol* 2011;96(3):287-294.

Flores-Muñoz M, Godinho BM, Almalik A, Nicklin SA. Adenoviral Delivery of Angiotensin-(1-7) or Angiotensin-(1-9) Inhibits Cardiomyocyte Hypertrophy via the Mas or Angiotensin Type 2 Receptor. *PLoS One* 2012;7(9):e45564.

Fraga-Silva RA, Costa-Fraga FP, De Sousa FB, Alenina N, Bader M, Sinisterra, RD, Santos RA. An orally active formulation of angiotensin-(1-7) produces an antithrombotic effect. *Clinics (Sao Paulo)* 2011;66(5):837-841.

Gembardt F, Westermann D, Heringer-Walther S, Schultheiss HP, Tschöpe C & Walter. Deficiency in the G protein-coupled receptor Mas leads to cardiomyopathy and demonstrates the importance of the endogenous ligand angiotensin-(1-7) for the cardiac function. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology* 2003;369.

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

Gomes ERM, Santos RA, Guatimosim S. Angiotensin-(1-7)-Mediated Signaling in Cardiomyocytes. *Int J Hypertens* 2012, doi:10.1155/2012/493129.

Gönczi M, Papp R, Kovács M, Seprényi G, Végh A. Modulation of gap junctions by nitric oxide contributes to the anti-arrhythmic effect of sodium nitroprusside. *Br J Pharmacol* 2009;156:786-793.

Guyton AC, Hall JE. *Tratado de fisiologia médica*. 11º ed: Elsevier, 2006.

Handa RK, Ferrario CM, Strandhoy JW. Renal actions of angiotensin-(1-7): in vivo and in vitro studies. *Am J Physiol Renal Physiol* 1996;270(1):F141-F147.

Hashimoto K. Arrhythmia models for drug research: classification of antiarrhythmic drugs. *J Pharmacol Scien* 2007;103(4):333-346.

Herath CB, Grace JA, Angus PW. Therapeutic potential of targeting the renin angiotensin system in portal hypertension. *World J Gastrointest Pathophysiol* 2013;4(1):1.

Hidalgo C, Donoso P, Carrasco AM. The Ryanodine Receptors Ca²⁺ Release Channels: Cellular Redox Sensors? *Life* 2005;57(4/5):315-322.

Hoffmann S, Krause T, van Geel PP, Willenbrock R, Pagel I, Pinto Y, et al. Overexpression of the human angiotensin II type 1 receptor in the rat heart augments load induced cardiac hypertrophy. *J Mol Med* 2001;79:601-608.

Hwang SJ, Yamasaki M, Nakamura K, Sasaki N, Murakami M, Wickramasekara Rajapakshage BK, et al. Development and characterization of a strain of *Babesia gibsoni* resistant to diminazene aceturate in vitro. *J Vet Med Sci* 2010;72(6):765-771.

Jian Z, Han H, Zhang T, Puglisi J, Izu LT, Shaw JA, et al. Mechanochemotransduction during cardiomyocyte contraction is mediated by localized nitric oxide signaling. *Sci Signal* 2014;18:7-27.

Joyner J, Neves LA, Granger JP, Alexander BT, Merrill DC, Chappell MC, et al. Temporal-spatial expression of ANG-(1-7) and angiotensin-converting enzyme 2 in the kidney of normal and hypertensive pregnant rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2007;293:169-177.

Kawai Y, Hayashi I, Ito T, Kamibayashi K, Takada K, Kagawa A, Yamatodani T, Mashimo. Nicorandil prevents epinephrine-induced arrhythmias in halothane-anesthetized rats by nitric oxide-dependent mechanism. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 2002;366:522-527.

Kagawa K, Hayashi Y, Itoh I, Iwasaki M, Takada K, Kamibayashi T, et al. Identification of the central imidazoline receptor subtype involved in modulation of halothane-epinephrine arrhythmias in rats. *Anest Analg* 2005;101(6):1689-1694.

Kelly RA, Balligand JL, Smith TW. Nitric oxide and cardiac function. *Circ Res*. 1996;79:363-380.

Kiss A, Juhasz L, Seprenyi G, Kupai K, Kaszaki J, Vegh A. The role of nitric oxide, superoxide and peroxynitrite in the antiarrhythmic effects of preconditioning and peroxynitrite infusion in anaesthetized dogs. *Br J Pharmacol* 2010;160:1263-1272.

Kisvári G, Kovács M, Gardi J, Seprényi G, Kaszaki J, Végh A. The effect of acute simvastatin administration on the severity of arrhythmias resulting from ischaemia and reperfusion in the canine: Is there a role for nitric oxide? *Eur J Pharmacol* 2014;732:96-104.

Kohlstedt K, Trouvain C, Boettger T, Shi L, Fisslthaler B, et al. AMP-activated protein kinase regulates endothelial cell angiotensin-converting enzyme expression via p53 and the post-transcriptional regulation of microRNA-143/145. *Circ Res* 2013;112(8):1150-1158.

Kong MH, Fonarow GC, Peterson ED, et al. Systematic review of the incidence of sudden cardiac death in the united states. *J Am Coll Cardiol* 2011;57(7):794-801.

Kubo-Inoue M, Egashira K, Usui M, Takemoto M, Ohtani K, Katoh M, Shimokawa et al. Long-term inhibition of nitric oxide synthesis increases arterial thrombogenicity in rat carotid artery. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2002;282(4):478-484.

Kucharewicz I, Pawlak R, Matys T, Pawlak D, Buczek W. Antithrombotic effect of captopril and losartan is mediated by angiotensin-(1-7). *Hypertension* 2002;40(5):774-779.

Kulemina LV, Ostrov DA. Prediction of off-target effects on angiotensin-converting enzyme 2. *J Biomol Screen* 2011;16:878-885.

Kuriakose S and Uzonna JE. Diminazene aceturate (Berenil), a new use for an old compound? *Int Immunopharmacology* 2014;21:342-345.

Laster MJ, Johnson BH, Eger EI, Taheri S. A Method for Testing Epinephrine-Induced Arrhythmias in Rats. *Anest Analg* 1990;70(6):654-657.

Liu E, Xu Z, Li J, Yang S, Yang W, Li G. Enalapril, irbesartan, and angiotensin-(1-7) prevent atrial tachycardia-induced ionic remodeling. *Int J Cardiol* 2011;146(3):364-370.

Lim G, Venetucci L, Eisner DA, Casade B. Does nitric oxide modulate cardiac ryanodine receptor function? Implications for excitation-contraction coupling. *Cardiovasc. Res.* 2008;77:256-264.

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(13):1548-1550.

Machado E. Eletrocardiograma - Passo A Passo - Um Jeito Novo De Aprender. 2ª edição,ELGM; 2012.

Marques FD, Ferreira AJ, Sinisterra RD, Jacoby BA, Sousa FB, Caliani MV, et al. An oral formulation of angiotensin-(1-7) produces cardioprotective effects in infarcted and isoproterenol-treated rats. *Hypertension* 2011;57(3):477-483.

Massion PB, Feron O, Dessy C, Balligand JL. Nitric Oxide and Cardiac Function: Ten Years After, and Continuing. *Circ Res* 2003;93:388-398.

McKinney CA, Fattah C, Loughrey C, Milligan G, Nicklin SA. Angiotensin-(1-7) and angiotensin-(1-9): function in cardiac and vascular remodeling. *Clin Sci* 2014;126(12):815-27.

Miletich DJ, Albrecht R, Seals C. Responses to fasting and lipid infusion of epinephrine-induced arrhythmias during halothane anesthesia. *Anesthesiology* 1978;48(4):245-249.

Mordwinkin NM, Meeks CJ, Jadhav SS, Espinoza T, Roda N, Louie SG, Rodgers KE. Angiotensin-(1-7) administration reduces oxidative stress in diabetic bone marrow. *Endocrinology* 2012;153(5):2189-2197.

Moura MM, Santos RA, Fontes MAP. Evidence for a functional cardiac interaction between losartan and angiotensin-(1-7) receptors revealed by orthostatic tilting test in rats. *Br J Pharmacol* 2005;144:755-760.

Naffah-Mazzacoratti MG, Gouveia TLF, Simões PSR, Perosa SR. What have we learned about the kallikrein-kinin and renin-angiotensin systems in neurological disorders? *World J Biol Chem* 2014;5(2):130-140.

Nerbonne JM, Kass RS. Molecular physiology of cardiac repolarization. *Physiol Rev* 2005;85:1205-1253.

Neves LAA, Almeida AP, Khosla MC, Campagnole-Santos MJ, Santos RAS. Effect of angiotensin-(1-7) on reperfusion arrhythmias in isolated rat hearts. *Braz J Med Biol Res* 1997;30:801-809.

Ortiz-Pérez JT, Riera M, Bosch X, De Caralt TM, Perea RJ, Pascual J, Soler MJ. Role of Circulating Angiotensin Converting Enzyme 2 in Left Ventricular Remodeling following Myocardial Infarction: A Prospective Controlled Study. *PloS one* 2013;8(4):e61695.

Page IH, Helmer OM. A crystalline pressor substance (angiotonin) resulting from the reaction between renin and renin-activator. *J Exp Med* 1940;71(1):29-42.

Paula RD, Lima CV, Khosla MC. Angiotensin (1-7) potentiates hypotensive effect of bradykinin in conscious rats. *Hypertension* 1995;26:1154-1159.

Pendergrass KD, Pirro NT, Westwood BM, Ferrario CM, Brosnihan KB, Chappell MC. Sex differences in circulating and renal angiotensins of hypertensive mRen(2).Lewis but not normotensive Lewis rats. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol* 2008;295:10-20.

Qi Y, Zhang J, Cole-Jeffrey CT, et al. Diminazene aceturate enhances angiotensin-converting enzyme 2 activity and attenuates ischemia-induced cardiac pathophysiology. *Hypertension* 2013;62:746-752.

Rastaldo R, Pagliaro P, Cappello S, Penna C, Mancardi D, Westerhof N, Losano G. Nitric oxide and cardiac function. *Life Sci* 2007;81:779-793.

Rokita AG e Anderson ME. New therapeutic targets in cardiology: arrhythmias and Ca²⁺/calmodulin-dependent kinase II (CaMKII). *Circulation* 2012;126:2125-2139.

Sampaio WO, de Castro CH, Santos RA, Schiffrin EL, Touyz RM. Angiotensin-(1-7) counterregulates angiotensin II signaling in human endothelial cells. *Hypertension* 2007a;50(6):1093-1098.

Sampaio WO, Souza dos Santos RA, Faria-Silva R, da Mata Machado LT, Schiffrin L, Touyz RM. Angiotensin-(1-7) through receptor Mas mediates endothelial nitric oxide synthase activation via Akt-dependent pathways. *Hypertension*. 2007b;49:185-192.

Sampaio WO, Nascimento AA, Santos RA. Systemic and regional hemodynamic effects of angiotensin-(1-7) in rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2003;284(6):H1985-H1994.

Santos RA, Campagnole-Santos MJ, and Andrade SP. Angiotensin-(1-7): na update. *Regul Pept* 2000;91:45-62.

Santos RAS, Castro CH, Gava E, Pinheiro SV, Almeida AP, Paula RD et al. Impairment of in vitro and in vivo heart function in angiotensin-(1-7) receptor MAS knockout mice. *Hypertension* 2006;47:996-1002.

Santos RA, Ferreira AJ, Simões E Silva AC. Recent advances in the angiotensin-converting enzyme 2-angiotensin(1-7)-Mas axis. *Exp Physiol* 2008;93(5):519-527.

Santos RA, Ferreira AJ, Verano-Braga T, Bader M. Angiotensin-converting enzyme 2, angiotensin-(1-7) and Mas: new players of the renin-angiotensin system. *J Endocrinol* 2013;216(2):R1-R17.

Santos RA, Haibara AS, Campagnole-Santos MJ, Simões e Silva AC, Paula RD, Pinheiro SVB, et al. Characterization of a new selective antagonist for angiotensin-(1-7), D-Pro7-Angiotensin-(1-7). *Hypertension* 2003;41:737-743.

Sjöstrand FS, Andersson-Cedergren E, Dewey MM. The ultrastructure of the intercalated discs of frog, mouse and guinea pig cardiac muscle. *Journal of Ultrastructure Research* 1958;1:271-287.

Skeggs LT, Lentz KE, Kahn JR, Shumway NP, Woods KR. The amino acid sequence of hypertensin II. *J exp med* 1956;104(2):193-197.

Steckelings U, Kaschina E, Unger T. The AT2 receptor- A matter of love and hate. *Peptides* 2005;26(8):1401-9.

Štengl M. Experimental models of spontaneous ventricular arrhythmias and of sudden cardiac death. *Physiol. Res* 2010;59(1):25-31.

Stewart ML, Burchmore RJ, Clucas C, Hertz-Fowler C, Brooks K, Tait A, Macleod A, Turner CM, De Koning HP, Wong PE, Barrett MP. Multiple genetic mechanisms lead to loss of functional TbAT1 expression in drug-resistant trypanosomes. *Eukaryot Cell* 2010;9(2):336-343.

Su JB. Different cross-talk sites between the renin-angiotensin and the kallikrein-kinin systems. *J Renin Angiotensin Aldosterone Syst* 2013;0(0):1-10.

Tallant EA, Clark MA. Molecular mechanisms of inhibition of vascular growth by angiotensin-(1-7). *Hypertension* 2003;42(4):574-579.

Takada K, Sumikawa K, Kamibayashi T. Comparative efficacy of antiarrhythmic agents in preventing halothane-epinephrine arrhythmias in rats. *Anesthesiology* 1993;563-570.

Teixeira-Neto FJ, Massone F, Luna SP, Comacho AA, Júnior JR, Ishiy HM. The effects of atropine and methotrimeprazine on the epinephrine-induced arrhythmias in halothane-anesthetized dogs. *Can J Vet Res* 2001;65:116-124

Thaler MS. *The only EKG book you'll ever need*. Wolters Kluwer Health; 2010.

Thomas W, McEneaney V, Harvey BJ. Aldosterone-induced signalling and cation transport in the distal nephron. *Steroids* 2008;73(9):979-984.

Tikellis C, Bernardi S, Burns WC. Angiotensin-converting enzyme 2 is a key modulator of the renin-angiotensin system in cardiovascular and renal disease. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 2011;20(1):62-68.

Trask AJ, Averill DB, Ganten D, Chappell MC, Ferrario CM. Primary role of angiotensin-converting enzyme-2 in cardiac production of angiotensin-(1-7) in transgenic Ren-2 hypertensive rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2007;292(6):3019-3024.

Van Breemen VL. Intercalated discs in heart muscle studied with electron microscope. *Anat Rec* 1953;117:49-56;

Walker MJA, Curtis MJ, Hearse DJ, Campbell RWF, Janse MJ, Yellon DM, et al. The Lambeth Conventions: guidelines for the study of arrhythmias in ischaemia, infarction, and reperfusion. *Cardiovasc Research* 1988;22(7):447-455.

Ziolo MT, Katoh H, Bers DM. Positive and negative effects of nitric oxide on Ca²⁺ sparks: influence of beta-adrenergic stimulation. *Am J Physiol (Heart Circ Physiol)* 2001;281:H2295-H2303.