

Nívia Maria Santiago

Atenuação da Hipertensão DOCA-Sal, disfunção e remodelamento cardíaco em ratos transgênicos que apresentam um aumento dos níveis de Angiotensina-(1-7)

Orientadora: Prof^a Doutora Maria José Campagnole-Santos

Belo Horizonte

2008

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

Nívia Maria Santiago

Atenuação da Hipertensão DOCA-Sal, disfunção e remodelamento cardíaco em ratos transgênicos que apresentam um aumento dos níveis de Angiotensina-(1-7)

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Fisiologia e Farmacologia do Departamento de Fisiologia e Biofísica, do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para a obtenção do grau de mestre em fisiologia.

Orientadora: Prof^ª Dra. Maria José Campagnole-Santos

Belo Horizonte

2008

Este trabalho foi realizado no
Laboratório de Hipertensão Arterial do
Departamento de Fisiologia e Biofísica do
Instituto de Ciências Biológicas da
Universidade Federal de Minas Gerais
com o auxílio financeiro da PRONEX, CNPq, CAPES e Fapemig

Dedico esse trabalho a DEUS,
A meus queridos pais, irmãos e familiares
e ao meu amado Daniel

AGRADECIMENTOS

À Profa. Maria José, exemplo profissional e pessoal, os meus sinceros agradecimentos pela orientação, ensinamentos e carinho ao longo desses dois anos de convivência.

Ao professor Robson pelas importantes sugestões.

À Profa. Maria Cláudia Irigoyen e sua aluna Raquel do Incor-USP pela realização das análises ecocardiográficas.

Ao Laser pela realização das análises da imunofluorescência indireta.

À Marilene pela importante ajuda com a realização dos ensaios e pela amizade.

Ao Marcos Melo pela disponibilidade e importantes sugestões nas análises ecocardiográficas.

À Talita pelo cuidado e ajuda com o tratamento dos animais

Ao Zezé e Soninha, por estarem sempre disponíveis e pela boa convivência.

Aos professores Andréa Haibara e Marco Antônio pelos ensinamentos.

Aos colegas do laboratório de Hipertensão e do departamento de Fisiologia e Biofísica, em especial aos amigos, Flavinha, Vanice, Marcelo, Gonzaga, Dan, Carlos e Danny, Roberto, Mariana Braga, Mariana Rossette, Ana Quênia e Kyan, Renatinha, Janaína, Samuel e Rose. Obrigada pelo companheirismo e pelos divertidos momentos juntos.

À Priscila, Érica e Gisele, amigas do coração e companheiras para todas as horas.

À toda minha família e amigos de Itaúna, pelos momentos únicos que passamos juntos. Reencontrar vocês sempre foi uma renovação para retornar ao cotidiano.

Ao meu amado Daniel, pelo incentivo, apoio e cumplicidade incondicionais. Obrigada pela infinita paciência, dedicação e compreensão. O seu amor foi essencial para chegar até aqui.

Aos meus queridos pais, Tarcísio e Ieda, meus irmãos, Zezinho e Nana por estarem sempre de braços abertos à minha espera. Vocês são minhas preciosidades. Obrigada pelo incentivo, apoio e amor que fizeram com que essa jornada se tornasse mais fácil.

À DEUS, por estar sempre presente em minha vida, iluminando todos os meus passos.

SUMÁRIO

RESUMO	viii
ABSTRACT	ix
LISTA DE ABREVIATURAS	x
1. INTRODUÇÃO	
1. Considerações gerais: Sistema Renina Angiotensina	01
1.2. Angiotensina-(1-7)	03
1.2. Angiotensina-(1-7) na hipertensão arterial	08
1.3. Angiotensina-(1-7) na função cardíaca	11
1.4. Angiotensina-(1-7) no remodelamento cardíaco	14
2. OBJETIVOS	
2.1. Objetivo Geral	18
2.1.2. Objetivos Específicos	18
3. MATERIAL E MÉTODOS	
3.1. Animais	19
3.1.1 Animal Transgênico [TGR(A1-7)3292]	
3.2. Modelo de Hipertensão Arterial DOCA-Sal	21
3.2.1. Uninefrectomia (UNX)	21
3.2.2. Preparo e implante do DOCA	22
3.2.3. Ingestão de solução de NaCl 0,9% e KCl 0,2%	22
3.3. Grupos Experimentais	22

3.4. Medida da Pressão Arterial -----	23
3.5. Ecocardiografia -----	23
3.6. Análise da Hipertrofia Ventricular Esquerda -----	27
3.7. Análise da Expressão de <i>mRNA</i> -----	27
3.7.1. Coleta de Tecidos -----	27
3.7.2. Extração de RNA Total -----	28
3.7.3. Quantificação do RNA total -----	29
3.7.4. Tratamento do RNA com DNAase -----	29
3.7.5. Transcriptase Reversa -----	30
3.7.6. PCR (Reação em Cadeia da Polimerase) em Tempo Real	
3.8. Análise dos Níveis de Angiotensinas – Radioimunoensaio -----	33
3.8.1. Coleta do Plasma -----	33
3.8.2. Coleta e Homogeneização do VE -----	34
3.8.3. Extração das Amostras em Coluna BOND-ELUT C 18 -----	35
3.8.4. Radioimunoensaio -----	35
A. Radioimunoensaio para Ang-(1-7) -----	36
B. Radioimunoensaio para Ang II -----	38
3.8.5. Dosagem de Proteínas -----	40
3.9. Imunofluorescência Indireta -----	41
3.10. Análise Estatística -----	43
4. RESULTADOS	
4.1. Análise da Pressão Arterial Sistólica (PAS) durante os 30 dias de tratamento ----	44
4.2. Ecocardiografia -----	47

4.2.1. Fração de Ejeção (FE) -----	47
4.2.2. Fração de Encurtamento (ΔD %) -----	47
4.2.3. Relação diâmetro da Aorta/AE -----	50
4.2.4. Tempo de Relaxamento Isovolumétrico (TRIV) -----	50
4.2.5. Outros parâmetros -----	53
4.3. Análise da Hipertrofia Ventricular Esquerda -----	55
4.4. Análises dos componentes da matriz extracelular do ventrículo esquerdo -----	57
4.4.1. Expressão de RNAm para o colágeno do tipo I e III -----	57
4.4.2. Imunofluorescência Indireta para o colágeno I e III -----	60
4.5. Análise dos níveis de Angiotensinas -----	63
4.5.1. Dosagem de Ang-(1-7) e Ang II no plasma -----	63
4.5.2. Dosagem de Ang-(1-7) e Ang II no VE -----	64
4.6. Análise da Expressão do <i>mRNA</i> dos componentes do SRA no VE -----	70
4.6.1. ECA 2 -----	70
4.6.2. ECA -----	70
4.6.3. Receptor <i>Mas</i> -----	73
4.6.4 Receptor AT ₁ -----	74
5. DISCUSSÃO -----	79
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS -----	92

RESUMO

A Ang-(1-7) possui um importante papel no controle cardiovascular e seus efeitos cardioprotetores tornam-se cada vez mais evidentes. O objetivo deste estudo foi avaliar o desenvolvimento da hipertensão arterial (HA) do tipo DOCA-Sal, remodelamento e função cardíaca em ratos transgênicos que superexpressam Ang-(1-7) circulante, TGR(A1-7)3292 (TGR). Ratos TGR e Sprague-Dawley (SD) foram submetidos à uninefrectomia, implante de acetato de deoxicorticosterona (200 mg/ Kg) e ingestão de solução de NaCl, 0,9% e KCl, 0,2% por 30 dias (TGR-DOCA e SD-DOCA). Os animais dos grupos controle foram submetidos apenas à uninefrectomia. A pressão arterial sistólica (PAS) foi determinada por pletismografia de cauda no dia anterior à cirurgia e durante o desenvolvimento da HA-Doca-Sal. Após os 30 dias, a função ventricular sistólica e diastólica foi avaliada por ecocardiografia. Os animais foram sacrificados por decapitação seguida de coleta do VE e plasma para a realização das seguintes análises: razão entre o peso do VE/comprimento da tibia, expressão do *mRNA* e deposição de colágenos do tipo I e III no VE, dosagem dos níveis de Ang-(1-7) e Ang II no plasma e no VE e análise da expressão de *mRNA* de componentes do SRA no VE. Os animais TGR e SD apresentaram valores basais de PAS semelhantes e após a indução da HA apresentaram aumento da PAS ($p < 0,001$). No entanto, a PAS dos ratos TGR-DOCA foi significativamente menor que a PAS dos SD-DOCA em todo período avaliado ($p < 0,05$). Os ratos SD-DOCA apresentaram aumento da fração de ejeção e fração de encurtamento, caracterizando uma fase compensada da função cardíaca, no entanto, com sinais de disfunção diastólica com redução da relação do diâmetro Aorta/ AE e aumento do tempo de relaxamento isovolumétrico em comparação aos SD ($p < 0,05$). Os TGR-DOCA não apresentaram alteração na função ventricular sistólica e diastólica. Os animais TGR-DOCA apresentaram uma atenuação da hipertrofia cardíaca em relação aos animais SD-DOCA ($p < 0,05$). A expressão dos colágenos do tipo I e III não diferiu entre os grupos em condições basais, mas após a indução da hipertensão os animais TGR-DOCA apresentaram uma menor expressão do *mRNA* do colágeno do tipo I e III quando comparados aos SD-DOCA ($p < 0,05$). Os TGR apresentaram níveis elevados de Ang-(1-7) no plasma, sem alteração da Ang II plasmática, associado à redução dos níveis de Ang

II no VE ($p < 0,05$), sem alteração nos níveis de Ang-(1-7) no VE. Após a hipertensão DOCA-Sal foi observado redução dos níveis de Ang II no plasma e no VE nos SD, sem alteração nos níveis de Ang-(1-7). No entanto, os ratos TGR-DOCA mostraram uma atenuação nos níveis elevados de Ang-(1-7) no plasma e aumento de ~2,5 vezes nos níveis de Ang-(1-7) no VE, associado a redução dos níveis de Ang II ($p < 0,05$). Os ratos TGR apresentaram um aumento da expressão de *mRNA* para a ECA2 no VE, sem alteração da expressão do *mRNA* para a ECA. No entanto, os animais TGR-DOCA apresentaram redução da expressão da ECA e redução da ECA2 a níveis similares aos do SD. A expressão do *mRNA* para o receptor *Mas* reduziu no VE dos ratos TGR após a hipertensão ($p < 0,05$), enquanto a expressão para o receptor AT_1 não alterou nos ratos TGR-DOCA. Os resultados de nosso estudo mostram que o aumento crônico dos níveis de Ang-(1-7) atenua a hipertensão arterial, disfunção ventricular e produção de fibrose cardíaca após a indução do modelo de hipertensão DOCA-Sal. Nossos dados sugerem ainda que estes efeitos podem estar relacionados a um aumento nos níveis de Ang-(1-7) no coração.

ABSTRACT

It is currently accepted that Ang-(1-7) has an important role in cardiovascular control and its cardioprotective effects have become increasingly evident. The purpose of this study was to evaluate the development of arterial hypertension in DOCA-Salt model and its effects on cardiac function and remodeling in transgenic rats that overproduce circulating Ang-(1-7), TGR(A1-7) 3292 (TGR). TGR and Sprague-Dawley (SD) rats were submitted to right nephrectomy, implantation of acetate deoxycorticosterone (200 mg / kg) and a daily intake of NaCl, 0.9% and KCl, 0.2% solution for 30 days (TGR-DOCA and SD-DOCA). The control groups were submitted only to uninefrectomy. The systolic blood pressure (SBP) was determined by tail pletismography before and during the development of DOCA-Salt-Hypertension. After 30 days, the systolic and diastolic ventricular function was assessed by echocardiography. The animals were sacrificed by decapitation and the left ventricle (LV) and plasma were collected for the following analysis: the ratio between the weight of LV/ length of the tibia, expression of *mRNA* and deposition of collagens in the LV, determination of Ang-(1-7) and Ang II levels in plasma and in the LV, and the expression of *mRNA* of the RAS components in the LV. TGR and SD had similar baseline SBP and had a significant increased after the surgery ($p < 0.001$). However, the SBP of the TGR-DOCA were significantly smaller than those of SD-DOCA during the whole period ($p < 0.05$). The SD-DOCA showed an increased ejection fraction and shortening fraction, suggesting a compensated phase of cardiac function. However, SD-DOCA presented signs of diastolic dysfunction with a reduction of the diameter of Aorta/ Left Atrium and increased the isovolumetric of relaxation time compared to SD ($p < 0.05$). The TGR-DOCA showed no change in cardiac function. The hypertrophy induced by DOCA-Salt-hypertension was attenuated in TGR rats. The expression of collagens did not differ between groups in baseline conditions, however after the induction of hypertension, animals TGR-DOCA had a lower expression of the *mRNA* of collagen type I and III compared to SD-DOCA ($p < 0.05$). The TGR showed higher levels of Ang-(1-7) in plasma, without any change in Ang II, associated with a reduction only in the levels of Ang II in LV ($p < 0.05$). In SD, the DOCA-salt hypertension reduced the levels of Ang II in plasma and LV, without any change in the levels of Ang-(1-7). However, in TGR-DOCA there was an attenuation of the high levels of Ang-(1-7) in plasma

and an increase in ~2.5 times in Ang-(1-7) levels in LV, which was associated with a reduction in levels of Ang II ($p < 0.05$). TGR showed an increase in mRNA expression for the ACE2 in LV, without changing the mRNA expression for ACE. TGR-DOCA reduced the mRNA expression for ACE and ACE2 in LV. The mRNA expression for Mas receptor in LV was reduced in TGR after hypertension ($p < 0.05$), whereas no change was observed in mRNA expression for AT₁ in TGR-DOCA. These data suggest that chronic increased levels of Ang-(1-7) reduces the level DOCA-Salt hypertension, cardiac dysfunction and fibrosis associated. These effects may be related to the increased levels of Ang-(1-7) in the heart.

LISTA DE ABREVIATURAS

- ✓ A779 - D- Ala⁷-Angiotensina-(1-7) - antagonista seletivo da angiotensina-(1-7)
- ✓ ACN - acetonitrila
- ✓ AE - átrio esquerdo
- ✓ Ang II - Angiotensina II
- ✓ Ang-(1-7) - Angiotensina-(1-7)
- ✓ Ang-(2-7) - Angiotensina-(2-7)
- ✓ Ang-(3-7) - Angiotensina-(3-7)
- ✓ Ang-(1-12) - Angiotensina-(1-12)
- ✓ AT₁ - receptor de Angiotensina II do tipo 1
- ✓ AT₂ - receptor de Angiotensina II do tipo 2
- ✓ BSA - albumina soro bovina
- ✓ DC - débito cardíaco
- ✓ DEPEC - dietil-pirocarbonato
- ✓ DMSO - dimetilsulfóxido
- ✓ DNAc - DNA complementar
- ✓ DO - densidade óptica
- ✓ DOCA - acetato de deoxicorticosterona
- ✓ $\Delta D \%$ - fração de encurtamento
- ✓ ECA - enzima conversora de angiotensina
- ✓ ECA 2 - enzima conversora de angiotensina 2
- ✓ EDTA - ácido etilenodinitrilotetraacético
- ✓ FC - frequência cardíaca
- ✓ FE % - fração de ejeção
- ✓ HA – hipertensão arterial
- ✓ HA DOCA-Sal – hipertensão arterial do tipo DOCA-Sal
- ✓ HCl – ácido clorídrico
- ✓ HFBA - ácido heptafluorobutírico
- ✓ KO-Mas – deleção genética para o receptor *Mas*
- ✓ MEC – matriz extracelular
- ✓ M-MLV - *Moloney murine leukemia virus reverse transcriptase*
- ✓ NaCl – cloreto de sódio
- ✓ NEP – endopeptidase neutra

- ✓ Onda A - maior valor da velocidade de fluxo telediastólico mitral (correspondente à contração atrial)
- ✓ Onda E – maior valor da velocidade de fluxo inicial do enchimento ventricular (enchimento rápido do ventrículo)
- ✓ PAS - pressão arterial sistólica
- ✓ PCR - reação em cadeia da polimerase
- ✓ PEP – prolil-peptidase
- ✓ PMSF - fenilmetilsulfonil fluorídrico
- ✓ POHHgBz - parahidroximercuriobenzoato
- ✓ relação Aorta/AE – relação do diâmetro da aorta e diâmetro do átrio esquerdo
- ✓ relação E/A - razão entre a velocidade máxima da onda E e a velocidade máxima da onda A
- ✓ RIE - radioimunoensaio
- ✓ RT - retrotranscrição
- ✓ SD - Sprague-Dawley Hannover
- ✓ SIVDIA - espessura diastólica do septo-interventricular
- ✓ SIVSIS - espessura diastólica da parede posterior
- ✓ SRA – sistema renina-angiotensina
- ✓ TE - tempo de ejeção
- ✓ TRIV - tempo de relaxamento isovolumétrico
- ✓ VE - ventrículo esquerdo
- ✓ VEC - velocidade de encurtamento circunferencial
- ✓ VEDIA - diâmetro do VE ao final da diástole
- ✓ VESIS - diâmetro do VE ao final da sístole
- ✓ UNX – uninefrectomia

1. INTRODUÇÃO

1.1. Considerações gerais: Sistema Renina Angiotensina

O sistema renina-angiotensina (SRA) é considerado um sistema endócrino circulante regulador essencial das funções cardiovasculares e renais. Este sistema desempenha um papel importante no controle da pressão arterial, na homeostase dos fluidos corporais e eletrólitos e na função celular (Ferrario e cols., 1997; Santos e cols., 2003).

Recentemente, o conceito clássico do SRA como um sistema hormonal circulante sofreu importantes modificações (Dostal e cols., 1999). A partir do avanço da biologia molecular e celular foram identificados novos peptídeos integrantes deste sistema, assim como novas interações hormônio-receptor e funções diferentes das já conhecidas. Além disso, o uso da biologia molecular possibilitou a identificação da presença de *mRNA* dos componentes do SRA em diferentes tecidos, o que sugere a existência de um sistema tecidual que não requer uma secreção hormonal na circulação sistêmica (Carey & Siragy., 2003). Desta forma, o SRA desempenha seu papel na manutenção da homeostase a partir de uma forma circulante e uma tecidual. Porém, a divisão deste sistema nessas duas formas torna-se, de certa forma, incorreta devido ao fato de existir uma possibilidade de interação entre a forma tecidual e circulante, uma vez que os tecidos podem captar os componentes circulantes e podem contribuir com a formação local de angiotensinas para o nível plasmático de peptídeos (Loundon e cols., 1993; Campbell e cols., 1987). Diante destas evidências, atualmente, o SRA é visto como um sistema que desempenha um importante papel na manutenção das funções de vários tecidos

como coração, vasos sanguíneos, rins, cérebro e glândulas endócrinas, a partir de sua atuação como um sistema endócrino, parácrino e autócrino (Wright e cols., 1992; Santos e cols., 2000).

A formação dos peptídeos do SRA consiste em uma cascata de reações que é iniciada quando o angiotensinogênio, liberado principalmente pelo fígado, é hidrolizado pela renina, para formar o decapeptídeo angiotensina I (Ang I). Este último peptídeo é convertido em Ang II a partir da ação da enzima conversora de angiotensina (ECA), uma enzima presente na superfície do endotélio vascular (Bader e cols., 2001; Santos e cols., 2000).

A Ang II é o principal mediador do SRA e suas ações são mediadas pela interação com dois tipos de receptores, AT_1 e AT_2 , que respondem de maneira diferente quando estimulados. A ligação da Ang II no receptor AT_1 resultam em vasoconstrição, assim como aumento da pressão arterial, aumento da contratilidade cardíaca, retenção de sódio e água nos túbulos renais, facilitação da liberação de catecolaminas pelas terminações nervosas e estimulação da liberação de aldosterona pela glândula adrenal (Dzau e cols., 1988). Além disso, esse receptor está envolvido com as ações a longo prazo da Ang II, como hipertrofia e remodelamento cardíaco, aterosclerose e aumento da espessura vascular, estando distribuído de forma abundante em diversos tecidos, como vasos sanguíneos, coração, cérebro e pulmões (Weir & Dzau., 1999; Timmermans e cols., 1993).

A estimulação do receptor AT_2 induz, na maioria das vezes, efeitos opostos aos observados pelas ações mediadas pelo receptor AT_1 , como inibição do crescimento celular, reparação tecidual e efeito vasodilatador. Além disso, o receptor AT_2 possui uma expressão mais limitada, sendo encontrado principalmente nos tecidos em

desenvolvimento fetal, o que sugere um papel relacionado com a morfogênese dos órgãos (Kim & Iwao., 2001; Dzau e cols., 1988).

A Ang II foi considerada, por muito tempo, o único produto com ação biológica da cascata enzimática do SRA, de forma que a sua degradação levaria a formação de fragmentos biologicamente inativos (Goodfriend e cols., 1991). Entretanto, além da Ang II, considerada o principal mediador do SRA, outros peptídeos desse sistema podem ser considerados biologicamente ativos, como a Ang III, a Ang IV e a Ang-(1-7) (Schiavone e cols., 1988; Benter e cols., 1993).

1.2. Angiotensina-(1-7)

A Ang-(1-7) é um dos peptídeos biologicamente ativos do SRA, sendo amplamente estudada, principalmente por exercer um importante papel na modulação de várias ações da Ang II, como vasoconstrição e proliferação celular (Santos e cols., 2000). Esse peptídeo não apresenta o aminoácido fenilalanina na porção C-terminal, o que pode explicar a ausência de resposta pressora e de estimulação da ingestão de água (Campagnole-Santos e cols., 1992). A Ang-(1-7) apresenta alta seletividade e pode realizar ações similares, distintas ou mesmo opostas às ações da Ang II, como vasodilatação, natriurese, facilitação do baroreflexo, efeito anti-proliferativo, entre outros (Santos e cols., 2000).

A formação endógena de Ang-(1-7) foi observada pela primeira vez por Santos e cols. (1988) em homogenato de cérebro de cães. Além da possibilidade deste peptídeo ser formado endogenamente o que chamou a atenção neste estudo foi o fato de que a produção de Ang-(1-7) ocorria independente da ação da ECA. Estudos subsequentes mostraram os primeiros efeitos biológicos para a Ang-(1-7).

Schiavone e cols. (1988) mostraram que a Ang-(1-7) estimulava a secreção de vasopressina em implantes hipotálamo-hipofisário e Campagnole-Santos e cols. (1989) mostraram que a Ang-(1-7) desencadeava resposta cardiovasculares após a microinjeção no núcleo do trato solitário. Nesses dois estudos, a Ang-(1-7) foi equipotente a Ang II em exercer esses efeitos. Outros estudos demonstraram a existência da Ang-(1-7) no plasma em diferentes espécies, assim como sua formação independente da via clássica da ECA (Santos e cols., 1988; Santos e cols., 1990; Chappell e cols., 1990; Santos e cols., 1992a). Estudos subsequentes mostraram que a Ang-(1-7) desencadeia outras ações centrais (Campagnole-Santos e cols., 1990; Campagnole-Santos e cols., 1992; Benter e cols., 1993; Fontes e cols., 1994; Santos e cols., 1994) e periféricas (Santos & Baracho, 1992b; Pörsti e cols., 1994, Paula e cols., 1995).

Atualmente se sabe que a formação de Ang-(1-7) pode ocorrer diretamente a partir da Ang I, através da ação de endopeptidases (prolil-peptidase – PEP; endopeptidase neutra - NEP) (Yamamoto e cols., 1992; Greene e cols., 1982), confirmando uma via de formação enzimática independente da ECA. Mais recentemente foi descoberta uma nova possibilidade de formação da Ang-(1-7) a partir de um peptídeo precursor da Ang I, a Ang-(1-12), através da NEP (Chappel e cols., 2007). Uma vez formada, a Ang-(1-7) pode ser hidrolisada por aminopeptidases formando Ang-(2-7) e Ang-(3-7), e também pela ECA gerando a Ang-(1-5) (Chappel e cols., 1998; Deddish e cols., 1998). A hidrólise da Ang-(1-7) pela ECA se constitui uma importante forma de inativação deste peptídeo circulante e tecidual (Santos e cols., 2000). Desta forma, o aumento dos níveis plasmáticos de Ang-(1-7) observados após a administração de inibidores da ECA deve-se tanto ao

aumento dos níveis de seu precursor, a Ang I, como pela menor degradação pela ECA (Iyer e cols., 1998).

Recentemente, uma enzima homóloga à ECA e com expressão limitada, a ECA 2, foi caracterizada em humanos (Vickers e cols., 2002; Crackower e cols., 2002). Esta enzima metaboliza vários peptídeos do SRA e está presente principalmente em células endoteliais de artérias, arteríolas e veias do coração e dos rins (Donoghue e cols., 2000). Ela é uma mono-carboxipeptidase que hidrolisa um único resíduo de Ang I para gerar Angiotensina-(1-9) [Ang-(1-9)] ou hidrolisa a Ang II formando Angiotensina-(1-7) [Ang-(1-7)] (Donoughe e cols., 2000). Diferentemente da ECA, a ECA2 não é bloqueada pelos inibidores de ECA (Vickers e cols., 2002). A principal função da ECA2 foi demonstrada a partir de estudos realizados *in vitro*, os quais mostraram que sua eficiência catalítica para Ang II é 400 vezes maior que para a Ang I, o que sugere que essa enzima seja a principal enzima para a formação de Ang-(1-7) (Turner e cols., 2002). As principais vias de formação dos peptídeos do SRA estão apresentadas na Figura 1.

As primeiras evidências de que a Ang-(1-7) exercia seus efeitos através de sua interação com um receptor diferente, foram obtidas por Campagnole-Santos e cols. (1992). Neste estudo, a Ang-(1-7) exerceu efeitos diferentes da Ang II sobre a sensibilidade do baroreflexo sugerindo que poderia existir um receptor específico para mediar as ações da Ang-(1-7). Outra evidência importante da existência de um receptor seletivo para mediar as ações da Ang-(1-7) foi obtida com a caracterização de um peptídeo homólogo, D-Ala⁷-Ang-(1-7), o A-779 como sendo um antagonista para diferentes ações centrais e periféricas da Ang-(1-7) (Santos e cols., 1994). O A-779 bloqueia as várias ações da Ang-(1-7) sem alterar os efeitos da Ang II ou deslocar a ligação da Ang II em preparação *in vitro*. A identificação da proteína *Mas*

como receptor para a Ang-(1-7) só foi obtida em 2003 por Santos e cols.. Nesse estudo foi mostrado que a deleção genética para o receptor *Mas* (Mas-KO) aboliu a ligação da Ang-(1-7) em rim de camundongo e o efeito anti-diurético desse peptídeo após aumento da sobrecarga de água. Além disso, o efeito vasodilatador da Ang-(1-7) foi abolido em aorta dos animais Mas-KO. Em conjunto, esses resultados identificam a proteína *Mas* como um receptor funcional para a Ang-(1-7) indicando as bases moleculares para as ações fisiológicas desse peptídeo.

Estudo realizado com animais com deleção genética para a proteína *Mas* mostrou que a ausência do receptor da Ang-(1-7) reduz a variabilidade da frequência cardíaca e produz um aumento do tônus simpático (Walther e cols., 2000). Outros trabalhos, utilizando os mesmos animais, mostraram que os Mas-KO apresentam redução da frequência cardíaca e aumento da resistência vascular coronária (Castro e cols., 2005). Estes resultados sugerem possível efeito cardioprotetor da Ang-(1-7) dependente de sua interação com o receptor *Mas*. Recentemente, Silva e cols. (2006) mostraram que as ações da Ang-(1-7) em aorta de ratos SD foram bloqueadas por outro peptídeo homólogo com característica de antagonista, o D-Pro⁷-Ang-(1-7), mas não pelo D-Ala⁷-Ang-(1-7). Este estudo sugere a existência de um outro subtipo de receptor para a Ang-(1-7).

A identificação da Ang-(1-7) como um peptídeo biologicamente ativo do SRA, associada com sua presença na circulação e em diferentes tecidos, tais como coração, rim, cérebro, vasos, entre outros, torna mais evidente a importância da Ang-(1-7) sobre o controle cardiovascular. Além disso, a descoberta do receptor *Mas* e da ECA2, caracteriza um novo eixo ECA2 - Ang-(1-7) - *Mas* do SRA como uma importante via contra-regulatória aos efeitos cardiovasculares mediados pelo eixo clássico ECA-Ang II-AT₁. Assim, na visão mais atual desse sistema haveria

dois braços contrareguladores dentro do SRA, de maneira que deficiências na formação ou na atividade da Ang-(1-7) poderiam alterar o balanço do sistema e contribuir para o desenvolvimento da hipertensão arterial e, por conseguinte, pode desencadear lesões em órgãos alvos, como coração, rim ou vasos. (Santos e cols., 2005; Santos e cols., 2008; Ferrario e cols., 2005).

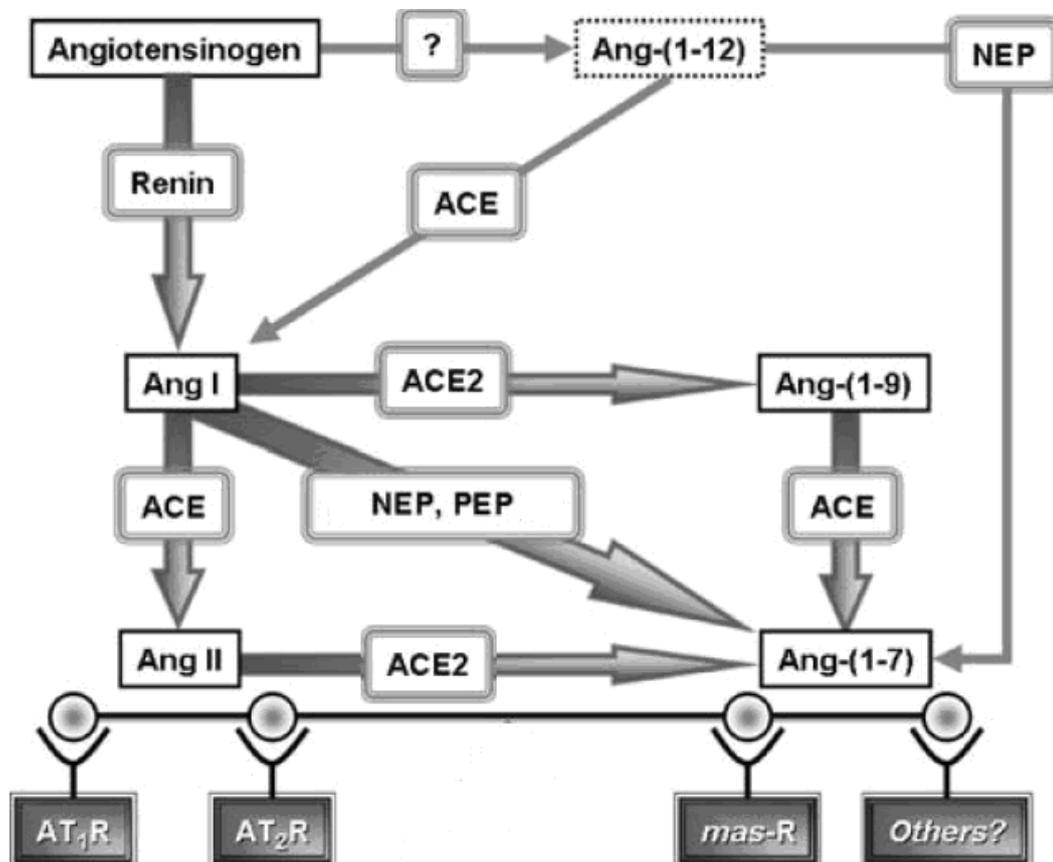


Figura 1 – Representação esquemática das principais vias de formação dos peptídeos do SRA e interações da Ang II e Ang-(1-7) com seus receptores. PEP,

prolil-peptidase; NEP, endopeptidase neutra. *Fonte: Varagic e cols., 2008* (Modificado).

1.2. Angiotensina-(1-7) na hipertensão arterial

Um dos efeitos primários da hipertensão arterial é o aumento da resistência periférica total, e o aumento da reatividade vascular é um dos fatores principais para o aumento do tônus vascular (Benter e cols., 2006). A Ang II exerce um importante papel na regulação da pressão arterial sistêmica através de sua ação direta nos vasos sanguíneos como um potente vasoconstritor. Esse peptídeo altera a pressão arterial através de seus efeitos em diferentes tecidos, incluindo alterações do tônus vascular, aumento da atividade do sistema nervoso simpático, alterações na estrutura e função de diferentes leitos vasculares e regulação sobre o balanço hidro-eletrolítico (Weir & Dzau, 1999).

A ação contrareguladora mais evidente da Ang-(1-7) é o seu efeito vasodilatador, envolvendo uma modulação sobre os efeitos da Ang II na resistência vascular (Rocks e cols., 1999). Vários estudos demonstram o efeito vasodilatador da Ang-(1-7) em diferentes tecidos e espécies (Brosnihan cols., 1996; Machado e cols., 2002). Estudos mais recentes demonstram que a Ang-(1-7) possui efeito vasodilatador em diferentes leitos vasculares, levando a uma redução da resistência total periférica, no entanto esse efeito é contrabalançado por aumento do débito cardíaco, o que explica a ausência de efeito sobre a PA basal em ratos anestesiados (Sampaio e cols., 2003; Botelho-Santos e cols., 2007).

Alguns estudos mostram que os efeitos vasodilatadores da Ang-(1-7) parecem ser dependentes do endotélio (Heitsch e cols., 2001; Fernandes e cols., 2005). Outros estudos demonstram que o endotélio é um importante sítio de

formação (Santos e cols., 1992) e metabolismo de Ang-(1-7) (Chappel e cols., 1998). Santos e cols. (2003) demonstraram que o efeito vasodilatador dependente do endotélio está ausente em camundongos com deleção genética para o receptor *Mas*. Faria-Silva e cols. (2005) mostraram que a estimulação do receptor *Mas* promove uma melhora da função endotelial por facilitar a liberação de NO. Mais recentemente, Sampaio e cols. (2007) observaram que a Ang-(1-7) induz a liberação de NO em células CHO e células endoteliais humanas transfectadas com o receptor *Mas* a partir da estimulação da fosforilação/ desfosforilação dos sítios estimulatório e inibitório da eNOS (*endothelial nitric oxide synthase*).

Existem evidências de que a Ang-(1-7) interage com cininas e promove um aumento da resposta vasodilatadora induzida pela bradicinina (BK), o que demonstra um importante papel deste peptídeo no controle do tônus vascular. A BK é um peptídeo endógeno que promove vasodilatação, dependente da liberação de óxido nítrico e prostaciclina (Linz e cols., 1995) e é degradado a peptídeos inativos pela ECA e outras endopeptidases (Graf e cols., 1993). A interação entre esses sistemas foi demonstrada no estudo realizado por Paula e cols. (1995), no qual a infusão de Ang-(1-7) exerceu um efeito potencializador das ações da BK, como um aumento da resposta hipotensora. Em um outro estudo, foi demonstrado a inibição dos efeitos vasculares da Ang-(1-7) a partir da administração de antagonistas do receptor B₂ de BK, sugerindo a existência de interação entre a Ang-(1-7) e o sistema cinina-caliceína (Brosnihan e cols., 1996). Outros trabalhos sugerem que a Ang-(1-7) poderia resensibilizar os receptores B₂ e promover uma potencialização dos efeitos vasodilatadores da BK (Tom e cols., 2001). Recentemente, Carvalho e cols. (2007) mostraram que o efeito do AVE 0991, um análogo não peptídico da Ang-(1-

7), na potenciação do efeito hipotensor da BK em animais normotensos ocorre via receptor *Mas* e envolve a liberação de NO.

A Ang-(1-7) está envolvida com a regulação da função renal (Dellipizzi e cols., 1994) o que pode explicar em parte as suas ações anti-hipertensivas (Benter e cols., 1993). Estudos recentes mostram que, *in vivo*, a Ang-(1-7) produz um efeito vasodilatador na arteríola aferente do rim de coelho através da liberação de NO (Ren e cols., 2002). Além disso, a Ang-(1-7) pode alterar o fluxo renal (Sampaio e cols., 2003) e produzir efeitos diuréticos e natriuréticos via inibição da bomba de $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$ nos túbulos renais (Chappell e cols., 2004). No entanto, outros trabalhos sugerem um efeito anti-diurético da Ang-(1-7) (Santos e cols., 2003; Ferreira e cols., 2004) e de acordo com esses achados, estudo realizado com ratos TGR da linhagem L3292 mostrou que o aumento sustentado de Ang-(1-7) promove uma redução do fluxo urinário, acompanhado de aumento da osmolaridade urinária em condições basais. Esses estudos, embora ainda não completamente esclarecidos, reforçam o envolvimento da Ang-(1-7) na modulação da função renal tubular e sua contribuição na regulação fisiológica do balanço hídrico (Ferreira e cols., 2004).

Além de seus efeitos diretos sobre os vasos sanguíneos e rins, alguns estudos sugerem que a Ang-(1-7) está envolvida com o controle tônico e reflexo da pressão arterial. No sistema nervoso central a Ang-(1-7) atua como um neuromodulador, especialmente em áreas relacionadas com o controle tônico e reflexo da pressão arterial. Estes efeitos foram bloqueados pelo A-779 (Oliveira e cols., 1996). Recentemente, Becker e cols. (2007) identificaram o receptor *Mas* em diferentes áreas centrais relacionadas com o controle cardiovascular e hidro-eletrolítico.

Já está bem estabelecido na literatura que os níveis plasmáticos de Ang-(1-7) e sua concentração tecidual podem aumentar com o uso de drogas anti-hipertensivas

(Luque e cols., 1996). O uso de bloqueadores de receptor AT_1 promove um aumento da concentração de Ang-(1-7) provavelmente devido a uma maior disponibilidade de Ang II para ser convertida em Ang-(1-7) pela ECA2 (Ferrario e cols., 2005; Ishiyama e cols., 2004). Já o aumento da concentração de Ang-(1-7), com o uso de inibidores da ECA, ocorre devido a uma maior concentração de Ang I, um precursor da formação deste heptapeptídeo, e devido também a inibição da sua degradação induzida pela ECA (Iyer e cols., 1998). Em humanos, o tratamento crônico com estas duas classes de drogas antihipertensivas está relacionado com um aumento dos níveis de Ang-(1-7) na urina (Luque e cols., 1996; Ferrario e cols., 2002). Assim, os efeitos benéficos produzidos pelo uso de inibidores de ECA e bloqueadores dos receptores AT_1 podem ser devidos, pelo menos em parte, às ações da Ang-(1-7) (Chappell e cols., 1998). Estudos anteriores de nosso laboratório mostraram que a melhora do controle baroreflexo da frequência cardíaca que se observa após o tratamento com inibidores da ECA em ratos hipertensos (SHR e 2RIC) está relacionada em parte às ações da Ang-(1-7) no SNC (Britto e cols., 1997, Heringer-Whalther e cols., 2001).

1.3. Angiotensina-(1-7) na função cardíaca

Atualmente, o papel da Ang-(1-7) na função cardíaca tem se tornado cada vez mais evidente. Vários estudos mostram que o coração e vasos sanguíneos são os principais alvos para as ações da Ang-(1-7) (Porsti e cols., 1994; Ferrario e cols., 2002). Além disso, a identificação da Ang-(1-7), ECA2 e receptor *Mas* no coração reforça o papel contra-regulador da Ang-(1-7) sobre os efeitos da Ang II na função cardíaca (Averill e cols., 2003; Crackower e cols., 2002; Tallant e cols., 2005).

Existem evidências da formação local de Ang-(1-7) no tecido cardíaco (Wei e cols., 2002; Zisman e cols., 2003). Santos e cols. (1990) mostraram a presença de Ang-(1-7) no efluxo venoso de coronárias, após oclusão aguda de artéria coronária em cães. Após infarto do miocárdio, Averill e cols. (2003) mostraram intensa imunorreatividade da Ang-(1-7) restrita aos cardiomiócitos e ao redor da área infartada em ratos.

Vários estudos mostram o efeito benéfico da Ang-(1-7) sobre a função cardíaca. A deleção genética da principal enzima envolvida com a formação de Ang-(1-7), a ECA2, induz um prejuízo da função cardíaca em condições basais (Crackower e cols., 2002), aumento da resposta pressora após administração de Ang II, sem alterações morfológicas cardíacas (Gurley e cols., 2006) e acelerada disfunção cardíaca após aumento da sobrecarga de pressão (Yamamoto e cols., 2006). Estudo realizado por Ferreira e cols. (2001) mostrou que a Ang-(1-7), apresenta um efeito anti-arritmogênico, reduzindo a incidência e duração das arritmias de reperfusão. Em estudo subsequente, Ferreira e cols. (2002) observaram que a Ang-(1-7) melhorou a função miocárdica após isquemia-reperfusão, principalmente por prevenir a redução da tensão sistólica usualmente observada após a reperfusão. Estudo realizado com ratos TGR da linhagem L3292 mostrou que o aumento crônico de Ang-(1-7) possui efeitos importantes sobre a contratilidade cardíaca, como observado na melhora da função pós-isquêmica em preparação de coração isolado (Santos e cols., 2004). Recentemente, De Mello e cols. (2004) mostraram que a Ang-(1-7) hiperpolariza as células cardíacas e reestabiliza a propagação do impulso cardíaco durante a isquemia de reperfusão, o que protege o miocárdio das conseqüências desse evento. Em contrapartida, Donoghue e cols. (2003) mostraram que animais transgênicos que superexpressam ECA2 no coração

apresentam um aumento da frequência de morte súbita e distúrbios de condução elétrica cardíaca. Estes distúrbios eletrofisiológicos, observados nos animais que superexpressam ECA2, podem estar relacionados à afinidade dessa enzima por substratos alternativos, anulando os efeitos cardioprotetores e arritmogênicos da Ang-(1-7) (Santos e cols., 2004; Santos e cols., 2003). Outros estudos mostram que a Ang-(1-7), em altas concentrações, pode exercer efeitos deletérios no coração, como a facilitação das arritmias de reperfusão em corações isolados de ratos (Neves e cols., 1997) e ativação da NAPH oxidase através de sua interação com o receptor AT_1 (Oudot e cols., 2005).

Diversos trabalhos mostram o efeito vasodilatador da Ang-(1-7) na circulação coronariana. Brosnihan e cols. (1996) demonstraram que a Ang-(1-7) induz um efeito vasodilatador de maneira dose-dependente em artérias de cães pré-contráidas. Este efeito não foi bloqueado pelos antagonistas específicos dos receptores de Ang II, candesartan e PD 123319, evidenciando a existência de um sítio de ligação específico para a Ang-(1-7) nos vasos coronarianos de cães. Porsti e cols. (1994) observaram um efeito vasodilatador da Ang-(1-7) em anéis de artérias coronárias de porcos, mediado pela liberação de NO pelo endotélio. Loot e cols. (2002) mostraram que a infusão crônica de Ang-(1-7) promoveu uma melhora da perfusão coronariana em ratos após infarto agudo do miocárdio. A Ang-(1-7) também potencializa o efeito vasodilatador da BK no leito coronariano de cães e roedores (Brosnihan e cols., 1998; Almeida e cols., 2000). Mais recentemente, Castro e cols. (2005) mostraram que o efeito vascular da Ang-(1-7) em preparação de coração isolado de camundongo é mais complexo do que anteriormente antecipado. Nesse estudo o efeito vasodilatador da Ang-(1-7) via receptor *Mas* é atenuado quando o receptor AT_1 não está bloqueado. Além disso, outro subtipo de

receptor que interage com o receptor AT_2 está presente e determina aumento de pressão de perfusão no coração isolado de camundongo.

Outros estudos mostram que a ação da Ang-(1-7) sobre a função cardíaca está relacionada com sua interação com o receptor *Mas*. Santos e cols. (2006) mostraram que animais com deleção genética do receptor *Mas* apresentaram uma redução da fração de encurtamento e acentuada redução da função ventricular global. Ferreira e cols. (2007a) mostraram que a administração oral do análogo não-peptídico da Ang-(1-7), AVE 0991, produziu uma redução da pressão de perfusão coronariana após infarto do miocárdio em preparação de coração isolado de rato. O uso do antagonista específico da Ang-(1-7) - A779 reverteu esse efeito sobre a pressão de perfusão, sugerindo que efeito o cardioprotetor da Ang-(1-7) ocorre via receptor *Mas*. O tratamento crônico com Ang-(1-7) ou a administração oral do AVE 0991, durante 4 semanas, também melhorou a função cardíaca pós-isquêmica em ratos SHR tratados com L-NAME (Benter e cols., 2006).

1.4. Angiotensina-(1-7) no remodelamento cardíaco

O remodelamento cardíaco é um processo adaptativo que envolve uma alteração na arquitetura cardíaca em resposta a sobrecargas hemodinâmicas, ativação neuro-humoral, processos inflamatórios, entre outros fatores (Chancey e cols., 2002). Tipicamente, o remodelamento cardíaco é acompanhado de alterações na quantidade e organização dos componentes da matriz extracelular cardíaca (MEC), o que pode alterar os parâmetros fisiológicos do coração. Desta forma, a função cardíaca é determinada pela interação coordenada e dinâmica entre as células contráteis e os componentes da MEC (Banerjee e cols., 2006). O aumento dos componentes da

MEC pode comprometer as propriedades elásticas do tecido cardíaco, o que contribui com o surgimento de quadro de disfunção diastólica. Além disso, o aumento progressivo da fibrose pode causar ainda um prejuízo da função sistólica (Baudino e cols., 2006; Brilla e cols., 1990). Sendo assim, o aumento na deposição de colágeno no tecido cardíaco é um fator de risco para o desenvolvimento de disfunção cardíaca.

Existem evidências sobre a expressão dos componentes do SRA em miofibroblastos cardíacos (Katwa e cols., 1997), que são as células responsáveis pela produção de colágeno no tecido cardíaco (Manabe e cols., 2002). Sadoshima & Izumo (1993) mostraram que a Ang II via seu receptor AT₁, *in vitro*, promoveu hipertrofia de cardiomiócitos e efeito mitogênico sobre os fibroblastos cardíacos. Já está bem elucidado na literatura que a Ang II induz a expressão de TGF- β em fibroblastos cardíacos (Manabe e cols., 2002) e que a inibição do SRA, com uso de inibidores de ECA e antagonistas do receptor AT₁, atenua a deposição de proteínas da MEC induzida por fatores de crescimento (Schultz e cols., 2002).

Diversos estudos têm mostrado o papel da Ang-(1-7) na modulação do remodelamento cardíaco. Averill e cols. (2003) observaram um aumento da imunorreatividade para a Ang-(1-7) restrita aos cardiomiócitos e ao redor da área infartada após ligadura da artéria coronária, o que sugere a participação deste peptídeo na recuperação do tecido cardíaco. Ferreira e cols. (2007) mostraram que o tratamento com AVE 0991, análogo não peptídico da Ang-(1-7), durante 7 dias reduziu a área infartada após ligadura da artéria coronária esquerda em ratos. De acordo com estas observações, Grobe e cols. (2007b) mostraram que a transfecção do gene da ECA2 em fibroblastos cardíacos reduziu a produção de colágeno por estas células em resposta à hipóxia aguda.

Tallant e cols. (2005) mostraram que a interação da Ang-(1-7) com o receptor *Mas* pode reduzir a síntese protéica em cultura de cardiomiócitos, desencadeada por diferentes indutores de crescimento celular, como a endotelina e FBS. Mais recentemente, a importância do receptor *Mas* na modulação da expressão das proteínas MEC foi avaliada por Santos e cols. (2006). Camundongos com deleção genética para este receptor apresentaram um aumento da expressão de colágeno do tipo I, III e fibronectina, acompanhado de redução dos níveis de colágeno VI no coração. Estes resultados sugerem que a interação a Ang-(1-7) - receptor *Mas* pode promover efeitos anti-fibróticos no coração.

A Ang-(1-7) pode exercer um papel contra-regulatório às ações da Ang II sobre o remodelamento cardíaco. Iwata e cols. (2005) mostraram que a Ang-(1-7), *in vitro*, pode reduzir a síntese de colágeno e hipertrofia cardíaca induzida pela Ang II, através de sua interação com o receptor *Mas* nos fibroblastos cardíacos. Grobe e cols. (2007a) mostraram que a coinfusão de Ang-(1-7) pode reduzir a fibrose cardíaca induzida pela infusão de Ang II. Existem evidências de que além da atenuação das alterações induzidas pela Ang II no coração, a infusão crônica de Ang-(1-7) pode reduzir os níveis cardíacos de Ang II, como observado por Mendes e cols. (2005). Resultados similares foram mostrados recentemente por Nadu e cols. (2008) em ratos TGR da linhagem L3292, que apresentam um aumento sustentado de Ang-(1-7) circulante. Santos e cols. (2004) mostraram ainda, que esses animais apresentam uma atenuação da deposição de colágeno e fibronectina no tecido cardíaco induzida pelo tratamento com isoproterenol. As ações da Ang-(1-7) sobre o remodelamento cardíaco já foram avaliadas no modelo de hipertensão DOCA-Sal (Grobe e cols., 2006). Neste estudo a infusão subcutânea de Ang-(1-7) durante 28 dias preveniu a fibrose cardíaca, sem alterar a hipertrofia cardíaca e os níveis

elevados de pressão arterial em ratos submetidos ao modelo de hipertensão DOCA-Sal.

Considerando os estudos anteriores de nosso laboratório e os dados da literatura é nossa hipótese que a Ang-(1-7) desempenha papel contra-regulatório atenuando a disfunção e remodelamento cardíaco induzidos pela hipertensão arterial, por alteração na formação e/ou ação local desse peptídeo. Nesse sentido, o presente estudo avaliou as alterações no perfil plasmático e cardíaco dos peptídeos angiotensinérgicos e de componentes do SRA relevantes para a produção (ECA2/ECA) e efeito da Ang-(1-7) e Ang II (Mas/ AT₁) em animais transgênicos que apresentam um aumento crônico de Ang-(1-7) circulante - [TGR(A1-7)3292] submetidos ao modelo de hipertensão DOCA-Sal.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

Avaliar o efeito dos níveis cronicamente elevados de Ang-(1-7) circulante, presente em ratos TGR(A1-7)3292, sobre a pressão arterial e alterações cardíacas após a indução do modelo de hipertensão arterial DOCA-Sal.

2.1.2. Objetivos Específicos

Avaliar em ratos [TGR(A1-7)3292] (TGR) e Sprague Dawley (SD) submetidos a hipertensão arterial do tipo DOCA-Sal:

1. Os níveis de Pressão Arterial Sistólica (PAS) durante o desenvolvimento da hipertensão Doca-Sal;
2. A função ventricular sistólica e diastólica;
3. A expressão de *mRNA* e distribuição do colágeno do tipo I e III no ventrículo esquerdo;
4. Os níveis plasmáticos e cardíacos de Ang-(1-7) e Ang II;
5. A expressão de *mRNA* dos componentes do SRA no coração (receptor *Mas*, receptor AT₁, ECA2 e ECA)

4. RESULTADOS

4.1. Análise da Pressão Arterial Sistólica (PAS) durante os 30 dias de tratamento

A Tabela 7 e a Figura 3 mostram os valores de PAS medidos por pletismografia nos animais SD e TGR antes (tempo zero) e 10, 20 e 30 dias após a cirurgia para indução da HA. Os animais SD e TGR apresentaram valores basais de PAS similares, antes da cirurgia. Durante o desenvolvimento da HA DOCA-Sal, os animais SD-DOCA apresentaram um aumento da PAS a partir do 10º dia da indução da hipertensão em relação ao seu controle ($141 \pm 3,6$ vs $126 \pm 2,1$ mmHg; respectivamente; $p < 0,01$), enquanto os ratos TGR-DOCA se tornaram hipertensos apenas a partir do 20º dia da cirurgia ($147 \pm 3,8$ vs $131 \pm 2,4$ mmHg nos ratos TGR-UNX; $p < 0,05$). Além disso, os ratos TGR-DOCA tiveram uma atenuação da HA durante todo o período avaliado, no 10º, 20º e 30º dia da cirurgia ($127 \pm 5,3$ mmHg; $148 \text{ mmHg} \pm 4,6$ mmHg; $168 \text{ mmHg} \pm 3,1$ mmHg; respectivamente) quando comparados aos ratos SD-DOCA ($140 \pm 4,1$ mmHg; $170 \pm 2,6$ mmHg; $188 \pm 3,4$ mmHg; respectivamente; $p < 0,01$)

Não houve diferença nos valores de PAS entre os grupos SD-UNX e TGR-UNX ao longo dos 30 dias de avaliação (Tabela 7; Figura 3).

Tabela 7 - Valores de Pressão Arterial Sistólica (PAS), expressos em mmHg, obtidos por pletismografia de cauda em ratos SD e TGR, antes e no 10^o, 20^o e 30^o dia de hipertensão DOCA-Sal ou uninefrectomia.

Valores de pressão arterial sistólica (mmHg)				
	0	10 dias	20 dias	30 dias
SD-UNX	117 ± 4,6	126 ± 2,5	128 ± 3,4	123 ± 3,8
SD-DOCA	119 ± 4,7	141 ± 4,1*	171 ± 2,3*	188 ± 3,4*
TGR-UNX	123 ± 3,7	127 ± 2,1	131 ± 2,4	128 ± 2,5
TGR-DOCA	125 ± 5,1	128 ± 5,3 [#]	148 ± 4,6 ^{*#}	168 ± 3,1 ^{*#}

Os resultados estão apresentados como média ± EPM. * p<0,05 vs respectivo UNX; # p<0,05 vs SD-DOCA (Two-Way ANOVA seguido pelo teste de Bonferroni).

Medida da Pressão Arterial Sistólica

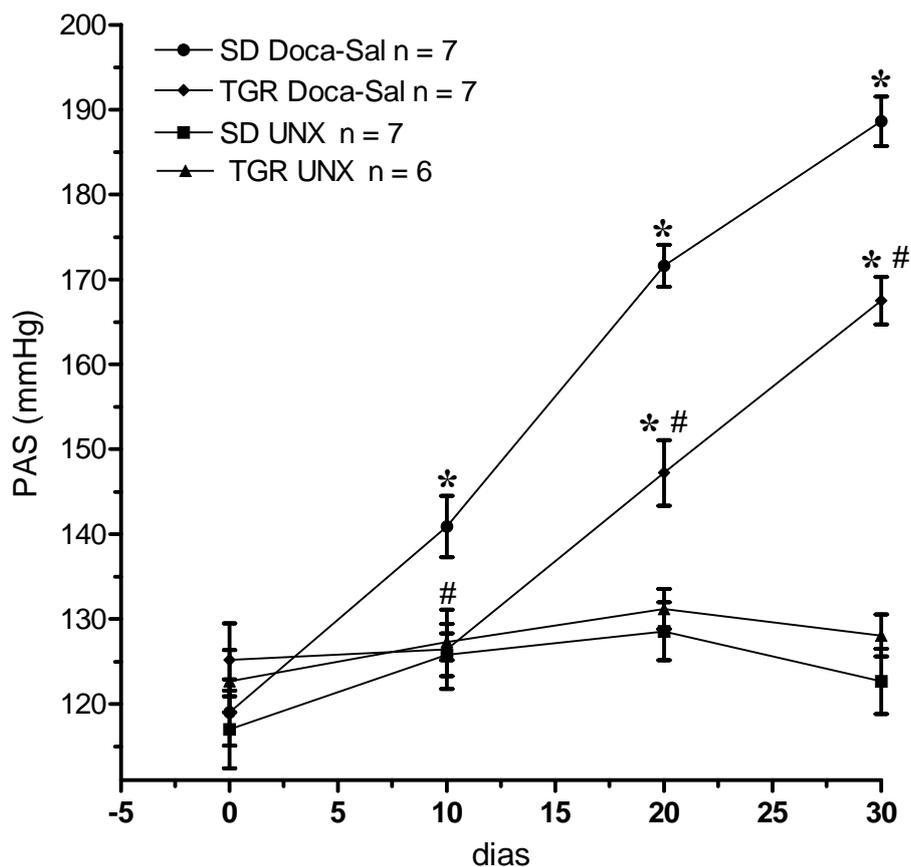


Figura 3 - Valores de Pressão Arterial Sistólica (PAS), expressos em mmHg, obtidos por pletismografia de cauda em ratos SD e TGR, antes e no 10^o, 20^o e 30^o dia de hipertensão DOCA-Sal ou uninefrectomia. Os resultados estão apresentados como média \pm EPM. * $p < 0,05$ vs respectivo UNX; # $p < 0,05$ vs SD-DOCA (Two-Way ANOVA seguido pelo teste de Bonferroni).

4.2. Ecocardiografia

4.2.1. Fração de Ejeção (FE) do VE

A Figura 4 mostra os resultados da FE analisados pela ecocardiografia. Após a indução da HA, os animais SD-DOCA ($0,794\% \pm 0,01$) apresentaram um aumento da FE em relação aos animais SD-UNX ($0,740\% \pm 0,01$; $p < 0,05$), enquanto os animais TGR-DOCA ($0,779 \pm 0,01$) não apresentaram diferença na FE em relação aos animais TGR-UNX ($0,758\% \pm 0,02$). Não houve diferença na FE entre os ratos UNX-SD ($0,740\% \pm 0,01$) e TGR-UNX ($0,758\% \pm 0,02$; Figura 4).

4.2.2. Fração de Encurtamento (ΔD %) do VE

A Figura 5 mostra os resultados da ΔD % analisados pela ecocardiografia. Após a HA, os animais SD-DOCA ($0,434\% \pm 0,01$) apresentaram um aumento da Δd % em relação aos SD-UNX ($0,384\% \pm 0,01$; $p < 0,05$). A HA não alterou a Δd % nos animais TGR-DOCA ($0,421\% \pm 0,02$) em relação aos TGR-UNX ($0,402\% \pm 0,02$). Não houve diferença na ΔD % entre os grupos SD ($0,384\% \pm 0,0$) e TGR ($0,402 \pm 0,02$) em condições basais (Figura 5).

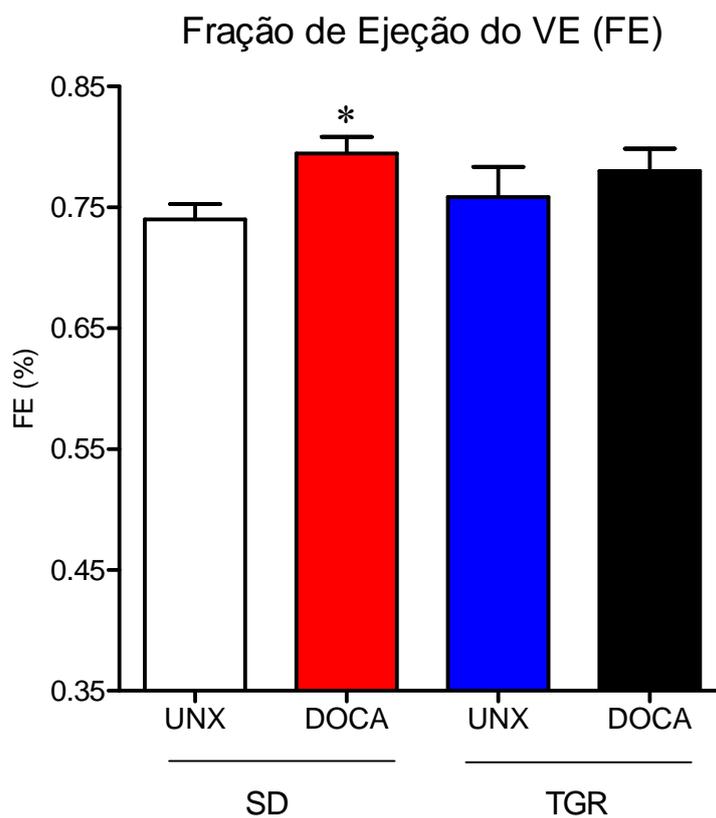


Figura 4 – Valores de FE analisados por ecocardiografia em animais SD e TGR após 30 dias de hipertensão DOCA-Sal ou uninefrectomia. SD-UNX (n=9); SD-DOCA (n=12); TGR-UNX (n=9); TGR-DOCA (n=10). Os resultados estão apresentados como média \pm EPM. * $p < 0,05$ vs SD-UNX (teste t de Student).

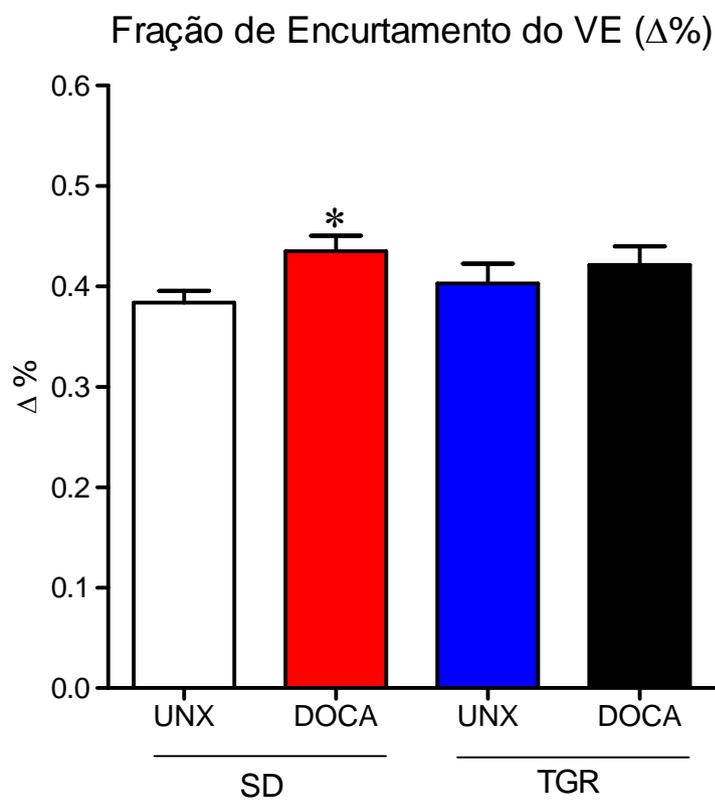


Figura 5 – Valores de ($\Delta d\%$) analisados por ecocardiografia em animais SD e TGR após 30 dias de hipertensão DOCA-Sal ou uninefrectomia. SD-UNX (n=9); SD-DOCA (n=12); TGR-UNX (n=9); TGR-DOCA (n=10). Os resultados estão apresentados como média \pm EPM. * $p < 0,05$ vs SD-UNX (teste t de Student).

4.2.3. Relação diâmetro da Aorta/AE

A Figura 6 mostra os resultados da relação diâmetro da Aorta/AE analisados pela ecocardiografia. Após a HA, os ratos SD-DOCA ($0,903 \pm 0,02$) apresentaram uma redução da relação Aorta/AE em relação ao seu controle ($0,992 \pm 0,007$; $p < 0,05$). A HA não alterou a relação Aorta/AE nos animais TGR-DOCA ($0,967 \pm 0,02$) em relação aos animais TGR-UNX ($1,00 \pm 0,01$). A relação Aorta/AE foi menor nos animais SD-DOCA ($0,903 \pm 0,02$) em relação aos animais TGR-DOCA ($0,967 \pm 0,02$; $p < 0,05$). Não houve diferença na relação Aorta/AE entre os animais SD ($0,992 \pm 0,007$) e TGR ($1,00 \pm 0,01$) em condições basais (Figura 6).

4.2.4. Tempo de Relaxamento Isovolumétrico (TRIV)

A Figura 7 mostra os resultados do TRIV analisados pela ecocardiografia. Após a HA, os ratos SD-DOCA ($30,91 \pm 1,26$) apresentaram um aumento do TRIV quando comparados com os SD-UNX ($26,33 \pm 0,66$; $p < 0,01$). Os animais TGR-DOCA ($30,10 \pm 1,44$) não apresentaram diferença no TRIV em relação aos animais TGR-UNX ($27,00 \pm 1,44$). Não houve diferença no TRIV entre os animais SD ($26,33 \pm 0,66$) e TGR ($27,00 \pm 1,44$) em condições basais (Figura 7).

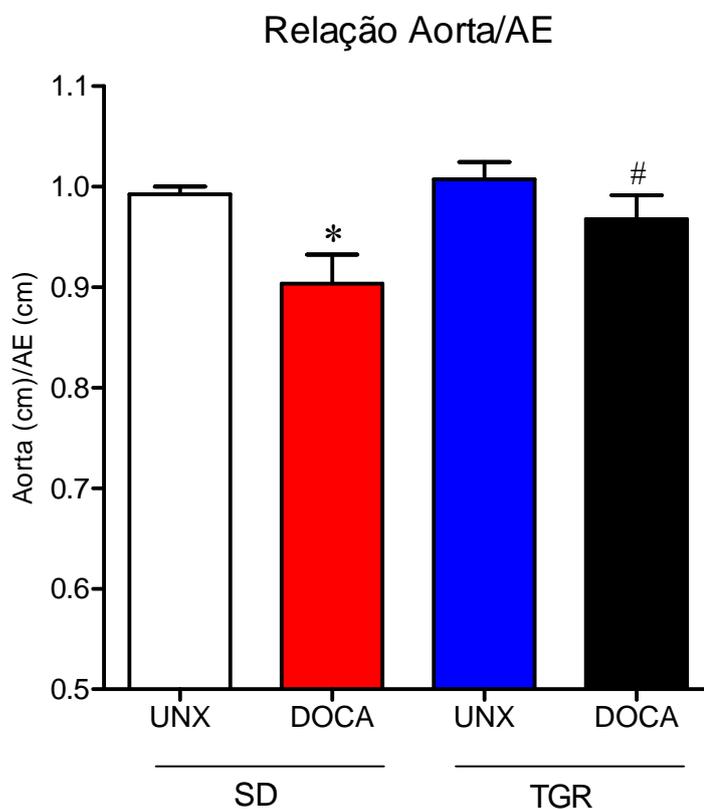


Figura 6 – Relação Aorta/AE analisada por ecocardiografia em animais SD e TGR após 30 dias de hipertensão DOCA-Sal ou uninefrectomia. SD-UNX (n=8); SD-DOCA (n=11); TGR-UNX (n=8); TGR-DOCA (n=9). Os resultados estão apresentados como média \pm EPM. * $p < 0,05$ vs SD-UNX; # $p < 0,05$ vs SD-DOCA (One-way ANOVA seguido de Newman - Keuls).

Tempo de Relaxamento Isovolumétrico (TRIV)

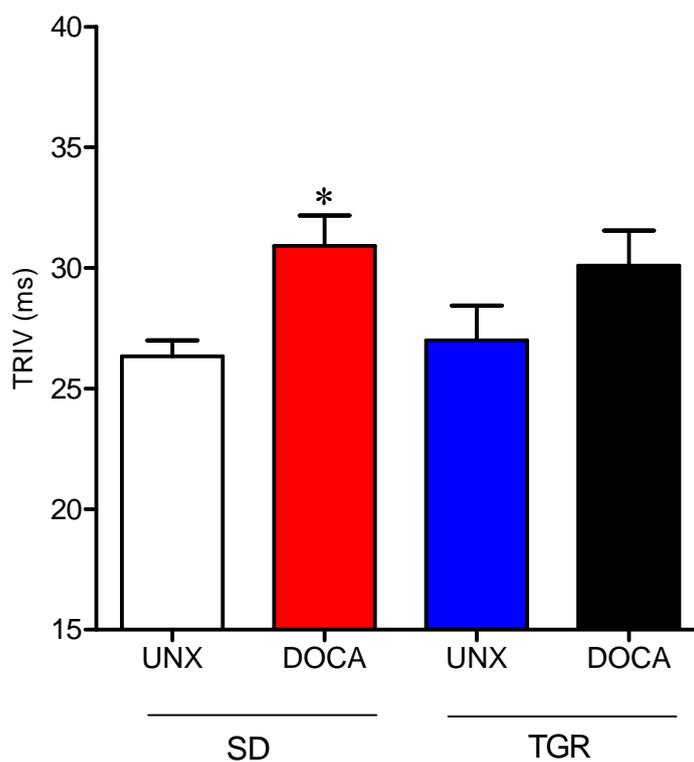


Figura 7 - Valores de TRIV analisados por ecocardiografia em animais SD e TGR após 30 dias de hipertensão DOCA-Sal ou uninefrectomia. SD-UNX (n=9); SD-DOCA (n=11); TGR-UNX (n=9); TGR-DOCA (n=10). Os resultados estão apresentados como média \pm EPM. * $p < 0,05$ vs SD-UNX (teste t de Student).

4.2.5. Outros indicadores

A Tabela 8 mostra os valores de diferença percentual de espessamento do septo interventricular (SIV%) e da parede posterior (PPVE%) na sístole e diástole, espessura relativa da parede (ERP), diâmetro do VE no final da diástole (VEDIA), velocidade de encurtamento circunferencial (VEC), débito cardíaco (DC), frequência cardíaca (FC) e relação dos picos E e A do fluxo transmitral (E/A) realizadas pela ecocardiografia.

Como observado na Tabela 8, a HA induziu nos animais SD-DOCA um aumento da SIV% em relação ao seu controle ($p < 0,01$), enquanto os animais TGR-DOCA não apresentaram diferença nesse parâmetro em relação aos TGR-UNX. Em contrapartida, a HA induziu um aumento da PPVE% nos ratos TGR-DOCA ($p < 0,05$), o que não foi observado nos ratos SD-DOCA. No entanto, apenas os animais SD-DOCA apresentaram um aumento da ERP em relação ao seu controle ($p < 0,05$). A HA induziu uma redução da relação E/A nos ratos TGR-DOCA em relação aos TGR-UNX ($p < 0,05$). Embora não tenha sido verificada diferença estatística, os animais TGR-UNX apresentaram um aumento da relação E/A quando comparados aos SD-UNX. Não houve diferenças entre os grupos SD e TGR, antes e após a HA, quanto ao VEDIA, VEC, DC e FC.

Tabela 8 – Parâmetros ecocardiográficos obtidos em ratos SD ou TGR após 30 dias de hipertensão DOCA-Sal ou uninefrectomia (UNX).

Parâmetros ecocardiográficos	Grupos experimentais			
	SD-UNX (8)	SD-DOCA (10)	TGR-UNX (8)	TGR-DOCA (9)
SIV (%)	54,0 ± 3,9	73,6 ± 3,4*	60,7 ± 2,9	61,8 ± 4,4
PPVE (%)	57,5 ± 4,1	62,4 ± 3,4	51,6 ± 1,4	61,6 ± 3,9*
ERP	0,40 ± 0,01	0,46 ± 0,02*	0,42 ± 0,02	0,47 ± 0,02
VEDIA (cm)	0,48 ± 0,02	0,43 ± 0,02	0,45 ± 0,03	0,44 ± 0,02
VEC (circ/s)	4,43 ± 0,20	4,91 ± 0,24	5,31 ± 0,39	4,81 ± 0,33
DC (ml/ min)	82,3 ± 8,0	83,8 ± 5,2	82,9 ± 9,0	87,7 ± 4,0
FC (bpm)	236 ± 4,3	234 ± 7,5	242 ± 7,7	224 ± 6,6
E/A (m/s)	1,8 ± 0,14	1,57 ± 0,09	2,21 ± 0,2	1,75 ± 0,08*

Os resultados estão apresentados como média ± EPM. Entre parêntesis número de animais de cada grupo. * p<0,05 vs respectivo UNX; # p<0,05 vs SD-DOCA (teste t de Student). SIV%=diferença percentual de espessamento do septo interventricular na sístole e diástole; PPVE%=diferença percentual de espessamento da parede posterior na sístole e diástole; ERP=espessura relativa da parede; VEDIA=diâmetro VE no final da diástole; VEC=velocidade de encurtamento circunferencial; DC=débito cardíaco; FC frequência cardíaca; E/A= relação dos picos E e A do fluxo.

4.3. Análise da Hipertrofia Ventricular Esquerda

A Figura 8 mostra os valores do peso do VE corrigido pelo comprimento da tíbia. Após a indução da HA, os ratos SD-DOCA ($0,25 \pm 0,006$ mg/cm) apresentaram um aumento de 15% da relação peso VE/comprimento da tíbia quando comparados aos ratos SD-UNX ($0,217 \pm 0,006$ mg/cm; $p < 0,05$), o que não foi observado nos animais TGR-DOCA ($0,227 \pm 0,007$ vs $0,204 \pm 0,008$ mg/cm; nos animais TGR-UNX). A relação peso VE/comprimento da tíbia foi menor nos animais TGR-DOCA ($0,227 \pm 0,007$ mg/cm) quando comparados aos animais SD-DOCA (vs $0,25 \pm 0,006$ mg/cm; $p < 0,05$). Não houve diferença significativa entre os grupos controle SD e TGR em condições basais ($0,217 \pm 0,006$ vs $0,204 \pm 0,008$ mg/cm; respectivamente; Figura 8).

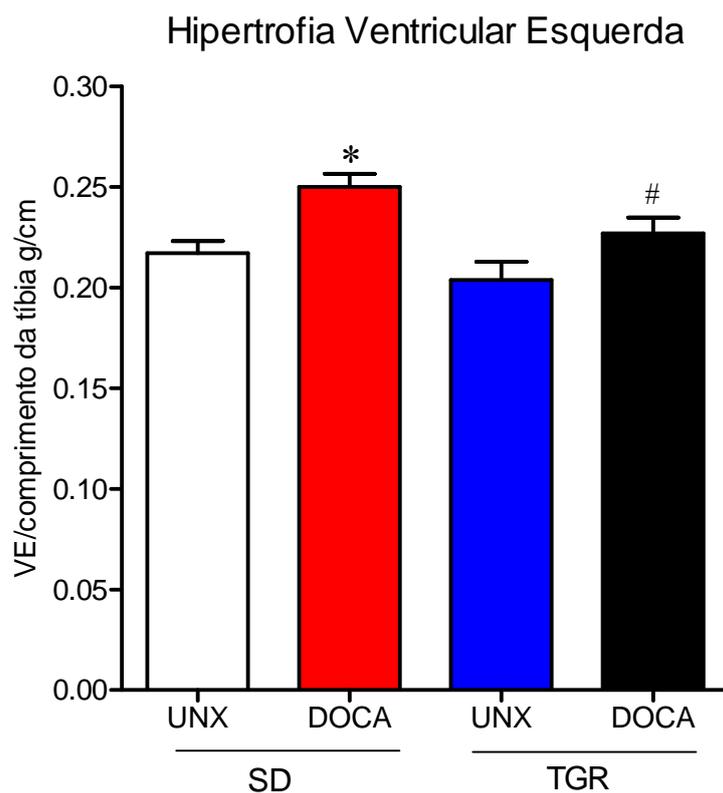


Figura 8 – Relação VE/comprimento da tibia em animais SD e TGR após 30 dias de hipertensão DOCA-Sal ou uninefrectomia. SD-UNX (n=5); SD-DOCA (n=7); TGR-UNX (n=6); TGR-DOCA (n=6). Os resultados estão apresentados como média \pm EPM. * $p < 0,05$ vs SD-UNX; # $p < 0,05$ vs SD-DOCA (One-way ANOVA seguido de Newman - Keuls).

4.4. Análise dos componentes da Matriz Extracelular no VE:

4.4.1. Expressão de *mRNA* para o colágeno do tipo I e III

A Figura 9 mostra os resultados da análise da expressão dos níveis de *mRNA* do colágeno do tipo I por RT-PCR em tempo real. O grupo SD-DOCA ($3,105 \pm 0,65$ U.R.) apresentou um aumento da expressão de *mRNA* para o colágeno do tipo I no VE quando comparado ao grupo SD-UNX ($1,00 \pm 0,20$ U.R., $p < 0,05$), enquanto os animais TGR-DOCA ($1,752 \pm 0,44$ U.R.) não apresentaram diferença significativa em relação ao seu controle ($1,447 \pm 0,28$ U.R.). Além disso, os ratos TGR-DOCA ($1,752 \pm 0,44$ U.R.) apresentaram uma menor expressão do colágeno do tipo I no VE em relação aos SD-DOCA ($3,105 \pm 0,65$ U.R., $p < 0,05$). Não foi observada diferença significativa entre os grupos SD-UNX e TGR-UNX ($1,00 \pm 0,20$ vs $1,447 \pm 0,28$ U.R.; respectivamente; Figura 9).

A Figura 10 mostra os resultados da análise da expressão dos níveis de *mRNA* do colágeno do tipo III por RT-PCR em tempo real. Os ratos SD-DOCA apresentaram um aumento da expressão de *mRNA* para o colágeno do tipo III comparados ao seu controle ($1,736 \pm 0,25$ vs $1,00 \pm 0,17$ U. R., respectivamente, $p < 0,05$), enquanto os animais TGR-DOCA não apresentaram diferença significativa em relação aos animais TGR-UNX ($1,222 \pm 0,16$ vs $0,961 \pm 0,10$ U. R., respectivamente, $p < 0,05$). Os níveis de *RNAm* para o colágeno do tipo III nos ratos TGR-DOCA ($1,222 \pm 0,16$ U.R.) foi menor em relação aos SD-DOCA ($1,736 \pm 0,25$ U. R.; $p < 0,05$). Não foi observada diferença significativa entre os grupos controles SD ($1,00 \pm 0,17$ U.R.) e TGR ($0,961 \pm 0,10$ U. R.) em condições basais (Figura 10).

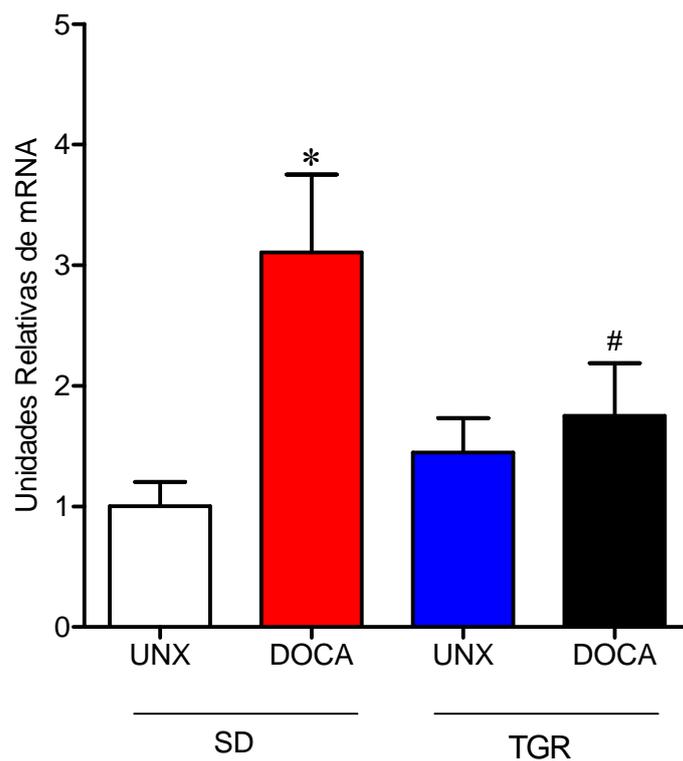
Expressão de *mRNA* para o colágeno do tipo I no VE

Figura 9 – Expressão do *mRNA* para o colágeno do tipo I analisada por Real Time RT-PCR em amostras de VE de animais SD e TGR após 30 dias de hipertensão DOCA-Sal ou uninefrectomia. SD-UNX (n=8); SD-DOCA (n=8); TGR-UNX (n=12); TGR-DOCA (n=9). Os resultados estão apresentados como média ± EPM. * $p < 0,01$ vs SD-UNX; # $p < 0,05$ vs SD-DOCA (One-way ANOVA seguido de Newman - Keuls).

Expressão de *mRNA* para o colágeno do tipo III no VE

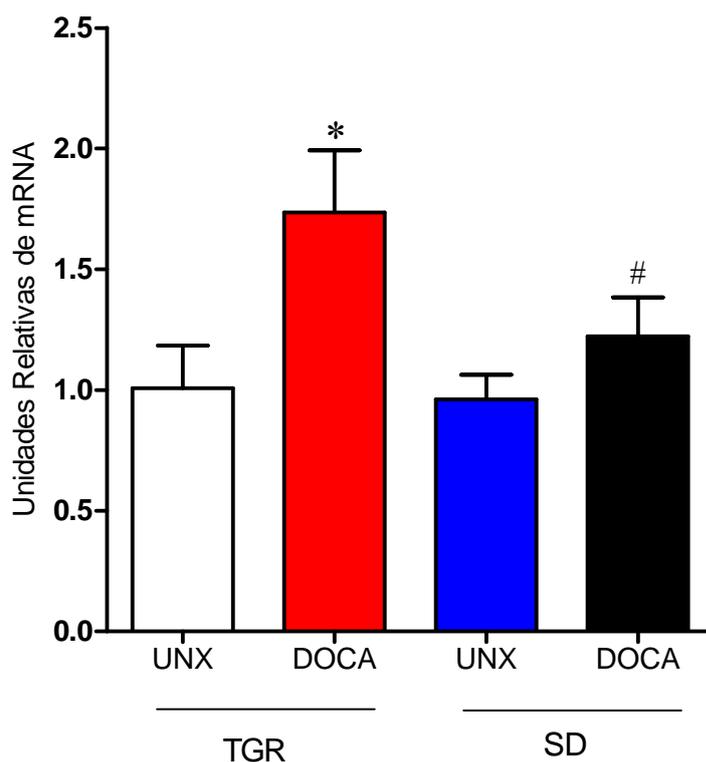


Figura 10 - Expressão do *mRNA* para o colágeno do tipo III analisada por Real Time RT-PCR em amostras de VE de animais SD e TGR após 30 dias de hipertensão DOCA-Sal ou uninefrectomia. SD-UNX (n=7); SD-DOCA (n=7); TGR-UNX (n=11); TGR-DOCA (n=12). Os resultados estão apresentados como média ± EPM. * $p < 0,05$ vs SD-UNX; # $p < 0,05$ vs SD-DOCA (One-way ANOVA seguido de Newman - Keuls).

4.4.2. Imunofluorescência Indireta para o colágeno I e III

As figuras 11 e 12 apresentam cortes transversais do VE de ratos SD e TGR, controle ou hipertensos, ilustrando a deposição de colágeno do tipo I e III por imunofluorescência. Os animais normotensos, SD-UNX e TGR-UNX, não apresentaram diferenças na distribuição de colágeno.

Após a indução da HA DOCA-Sal, foi observado um aumento da deposição de colágeno do tipo I (Figura 11) e colágeno do tipo III (Figura 12) no VE dos animais SD, enquanto que nos animais TGR este aumento foi atenuado.

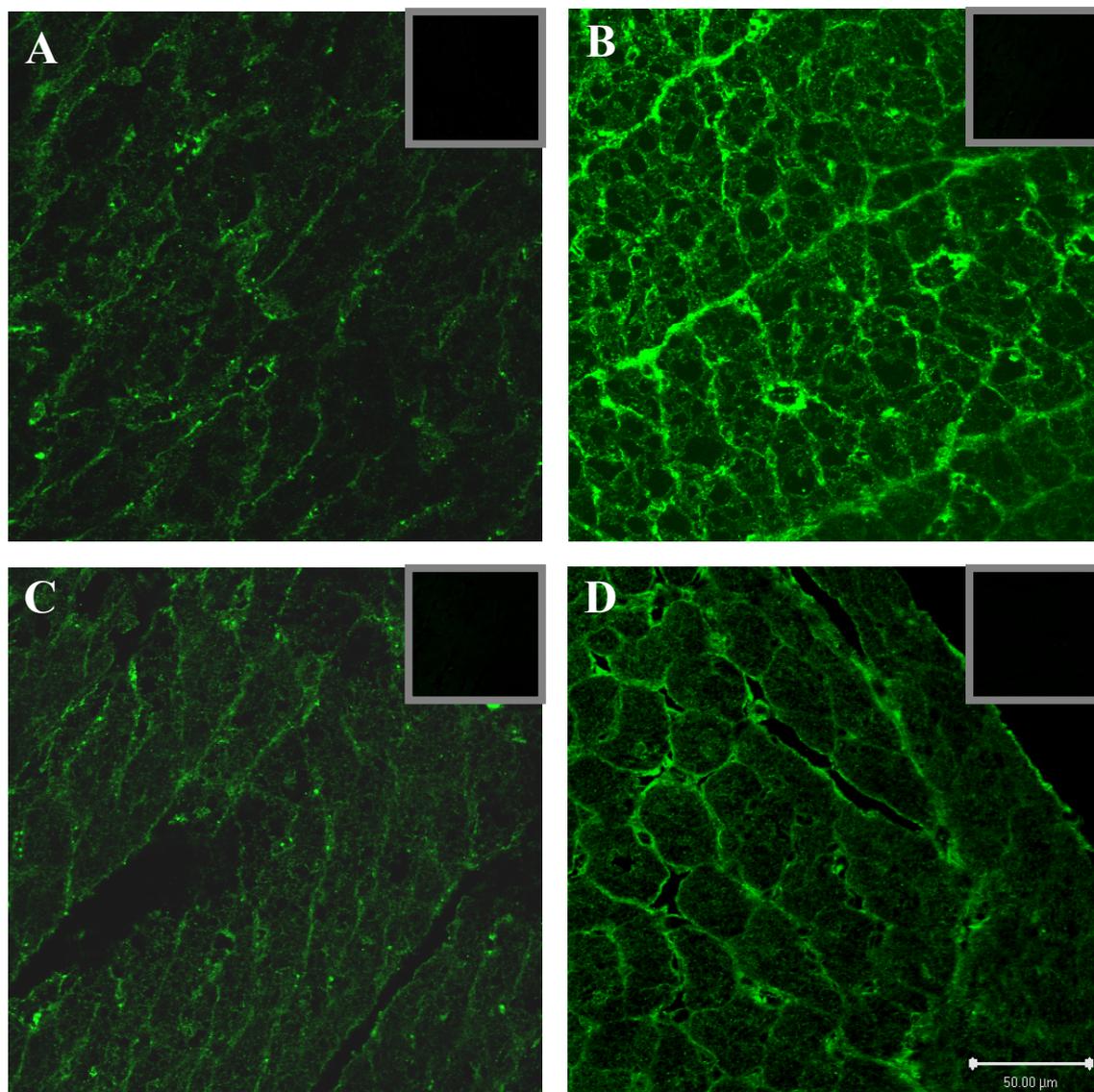


Figura 11 – Imunofluorescência indireta obtida por microscopia confocal de cortes transversais de VE, ilustrando a Imunolocalização de colágeno do tipo I (em verde) em ratos SD e TGR após 30 dias de uninefrectomia ou hipertensão DOCA-Sal. **A** (SD-UNX); **B** (SD-DOCA); **C** (TGR-UNX); **D** (TGR-DOCA). Aumento de 40x. Quadrado menor a direita: corresponde ao controle do secundário. Escala: corresponde a 50 µm.

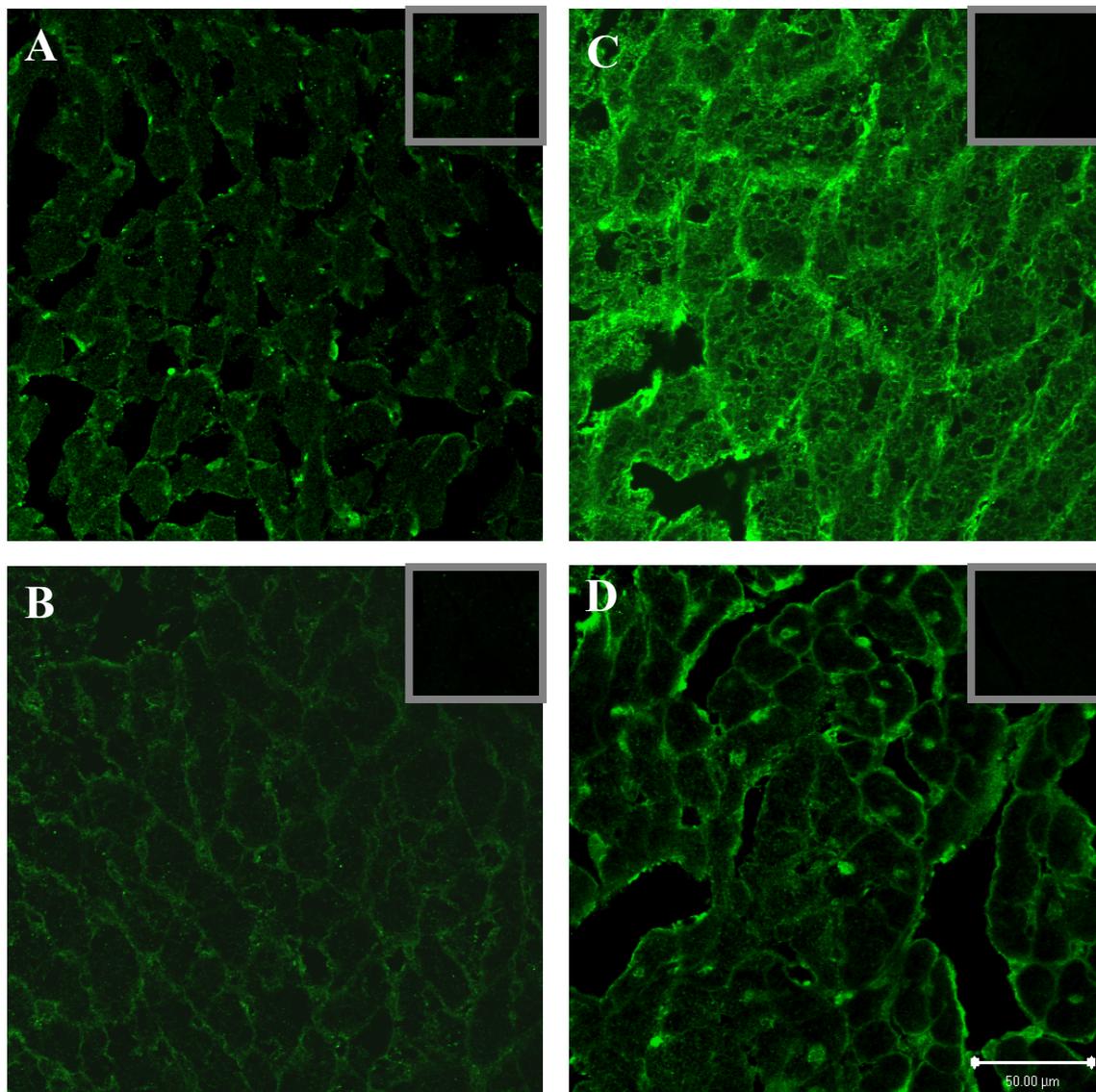


Figura 12 - Imunofluorescência indireta obtida por microscopia confocal de cortes transversais de VE, ilustrando a Imunolocalização de colágeno do tipo III (em verde) em ratos SD e TGR após 30 dias de uninefrectomia ou hipertensão DOCA-Sal. **A** (SD-UNX); **B** (SD-DOCA); **C** (TGR-UNX); **D** (TGR-DOCA). Aumento de 40x. Quadrado menor a direita: corresponde ao controle do secundário. Escala: corresponde a 50 µm.

4.5. Análise dos níveis de Angiotensinas

4.5.1. Dosagem de Ang-(1-7) e Ang II no plasma

A Tabela 9 e a Figura 13 mostram os resultados dos níveis plasmáticos de Ang-(1-7) analisados por RIE. Como esperado, os ratos TGR-UNX apresentaram um aumento dos níveis plasmáticos de Ang-(1-7) ($26,31 \pm 4,05$ pg/ml) quando comparados com os animais SD-UNX ($18,12 \pm 2,38$ pg/ml; $p < 0,05$). Após o desenvolvimento da HA, foi observada uma redução dos níveis deste peptídeo nos animais TGR-DOCA ($14,30 \pm 1,48$ pg/ml) em comparação com seu controle ($26,31 \pm 4,05$ pg/ml de plasma; $p < 0,01$). Esta redução não foi observada nos ratos SD-DOCA (Figura 13).

A Tabela 9 e a Figura 14 mostram os resultados dos níveis plasmáticos de Ang II analisados por RIE. Após a indução da HA, os animais TGR-DOCA apresentaram uma redução dos níveis de Ang II plasmáticos ($13,17 \pm 1,23$ pg/ml) em relação aos TGR-UNX ($18,30 \pm 2,4$ pg/ml; $p < 0,05$). Esta redução também foi observada nos ratos SD-DOCA ($10,07 \pm 0,79$ vs $17,82 \pm 2,63$ pg/ml; nos SD-UNX). Não houve diferença significativa na concentração de Ang II entre os ratos SD-UNX e TGR-UNX (Figura 14).

4.5.2. Dosagem de Ang-(1-7) e Ang II no VE

A Tabela 9 e a Figura 15 mostram os resultados dos níveis de Ang-(1-7) no VE analisados por RIE. Após a indução da HA, os animais TGR-DOCA apresentaram um aumento de aproximadamente 2,5 vezes nos níveis de Ang-(1-7) no VE ($4,19 \pm 0,78$ vs $1,53 \pm 0,09$ pg/mg de proteína; nos TGR-UNX; $p < 0,05$). Além disso, os ratos TGR-DOCA apresentaram níveis maiores de Ang-(1-7) quando comparados aos ratos SD-DOCA. A HA não alterou os níveis deste peptídeo nos ratos SD-DOCA ($1,80 \pm 0,69$ vs $1,39 \pm 0,20$ pg/mg de proteína; nos SD-UNX). Não houve diferença na concentração de Ang-(1-7) entre os animais SD-UNX e TGR-UNX (Figura 15).

A Tabela 9 e a Figura 16 mostram os resultados dos níveis de Ang II no VE analisados por RIE. Os níveis de Ang II no VE estavam reduzidos nos animais TGR-UNX ($2,71 \pm 0,58$ pg/mg de proteína) quando comparados com os animais SD-UNX ($4,128 \pm 0,26$ pg/mg de proteína; $p < 0,01$). Após a HA, foi observado um menor nível de Ang II no VE dos ratos SD-DOCA ($1,78 \pm 0,33$ vs $4,128 \pm 0,26$ pg/mg de proteína; nos SD-UNX; $p < 0,01$) e TGR-DOCA ($1,03 \pm 0,16$ vs $2,71 \pm 0,58$ pg/mg de proteína; nos TGR-UNX; $p < 0,05$; Figura 16).

Tabela 9 - Níveis de angiotensinas e relação Ang-(1-7)/Ang II obtidos no plasma e VE dos ratos SD e TGR após 30 dias de hipertensão DOCA-Sal ou uninefrectomia (UNX).

	Níveis de Angiotensinas					
	plasma (pg/ml)			VE (pg/mg/proteína)		
	Ang II	Ang-(1-7)	Ang-(1-7)/Ang II	Ang II	Ang-(1-7)	Ang-(1-7)/Ang II
SD-UNX	17,82 ± 2,6	18,12 ± 2,4	1	4,12 ± 0,3	1,39 ± 0,2	0,33
SD-DOCA	10,07 ± 0,8*	14,06 ± 1,3	1,4	1,78 ± 0,3*	1,8 ± 0,7	1,01
TGR-UNX	18,3 ± 2,5	26,31 ± 4,0 [#]	1,4	2,71 ± 0,6	1,53 ± 0,1	0,56
TGR-DOCA	12,24 ± 0,9*	14,30 ± 1,5*	1,2	1,03 ± 0,2*	4,19 ± 0,8* ^{&}	4,06

Os resultados estão apresentados como média ± EPM. * p <0,05 vs respectivo UNX; # p <0,05 vs SD-DOCA (teste t Student e One-way ANOVA seguido de Newman – Keuls).

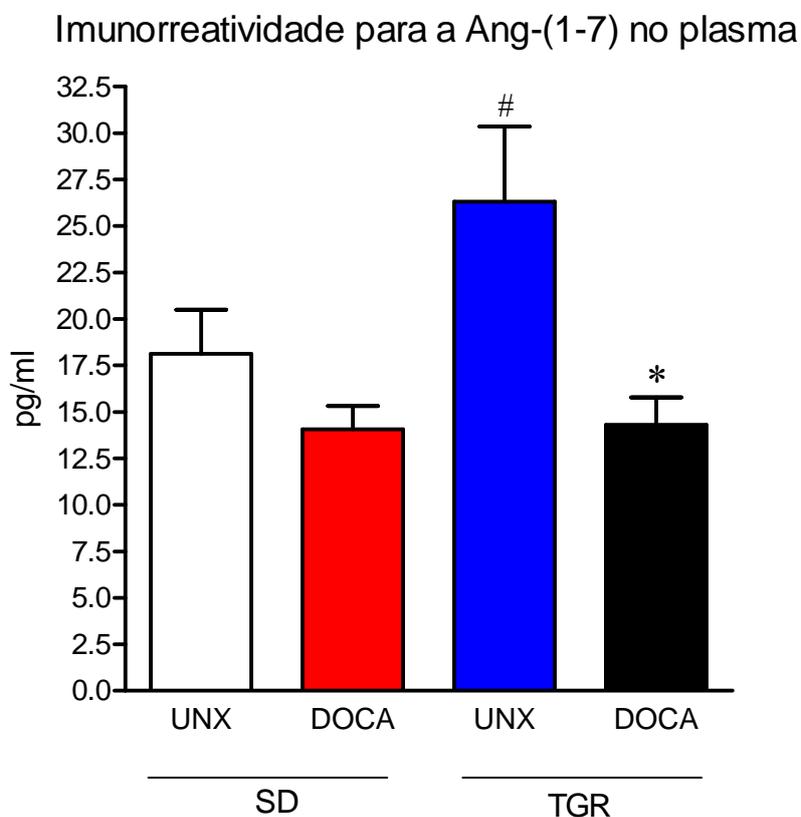


Figura 13 – Níveis de Ang-(1-7) plasmáticos em animais SD e TGR após 30 dias de DOCA-Sal ou uninefrectomia medidos por RIE após extração em colunas de C_{18} . Os valores estão expressos como picogramas do peptídeo por mililitros de plasma. SD-UNX (n=10); SD-DOCA (n=7); TGR-UNX (n=11); TGR-DOCA (n=12). Os resultados estão apresentados como média \pm EPM. # $p < 0,05$ vs SD-UNX; * $p < 0,01$ vs TGR-UNX (One-way ANOVA seguido de Newman - Keuls).

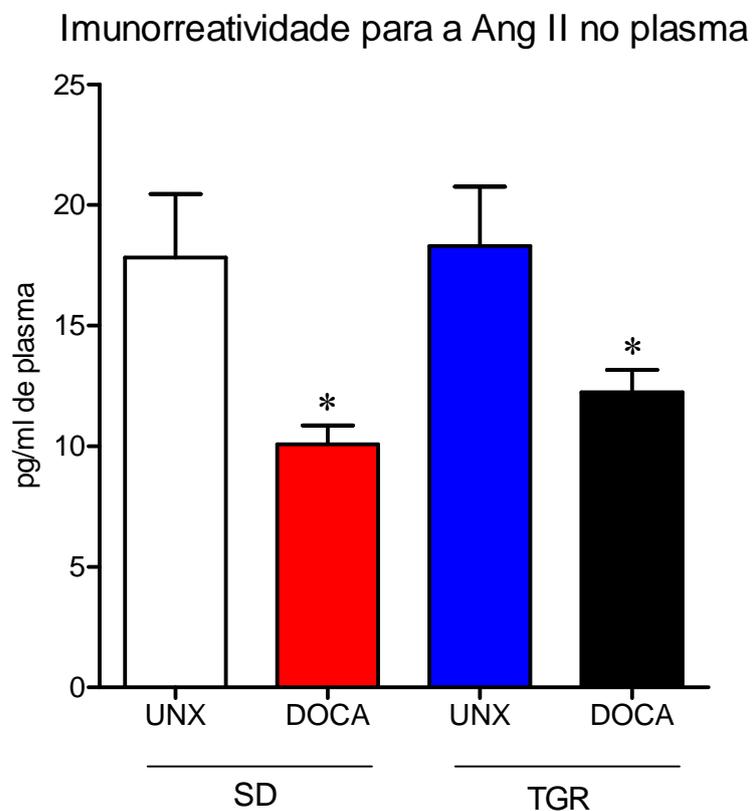


Figura 14 - Níveis de Ang II plasmáticos em animais SD e TGR após 30 dias de hipertensão DOCA-Sal ou uninefrectomia medidos por RIE após extração em colunas de C_{18} . Os valores estão expressos como picogramas do peptídeo por mililitros de plasma. SD-UNX (n=6); SD-DOCA (n=6); TGR-UNX (n=8); TGR-DOCA (n=9). Os resultados estão apresentados como média \pm EPM. * $p < 0,05$ vs respectivo UNX (teste t Student).

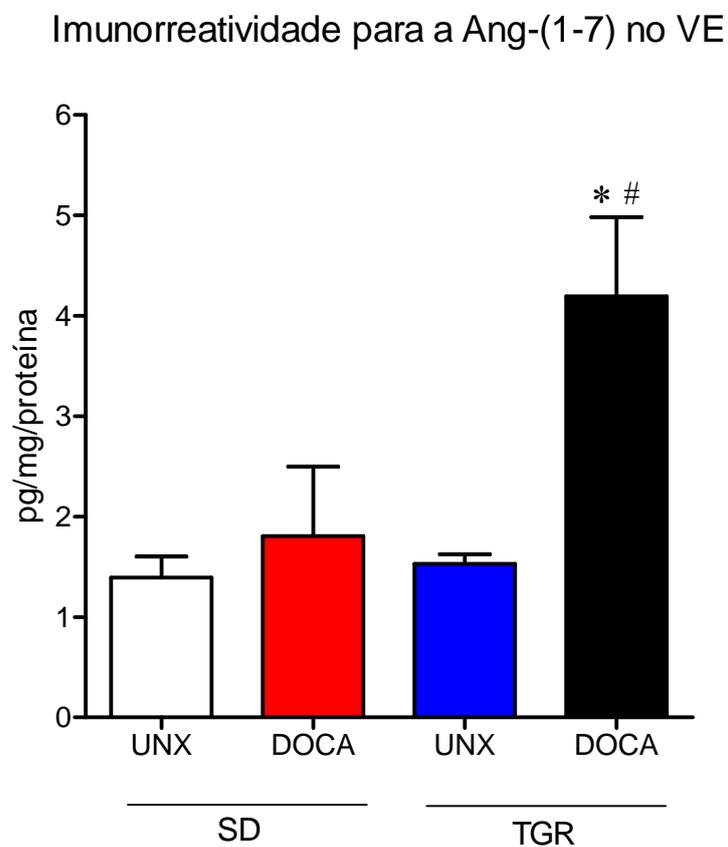


Figura 15 - Níveis de Ang-(1-7) no VE de animais SD e TGR após 30 dias de hipertensão DOCA-Sal ou uninefrectomia medidos por RIE após extração em colunas de C_{18} . SD-UNX (n=5); SD-DOCA (n=5); TGR-UNX (n=3); TGR-DOCA (n=4). Os resultados estão apresentados como média \pm EPM. * $p < 0,05$ vs TGR-UNX; # $p < 0,01$ vs SD-DOCA (One-way ANOVA seguido de Newman - Keuls).

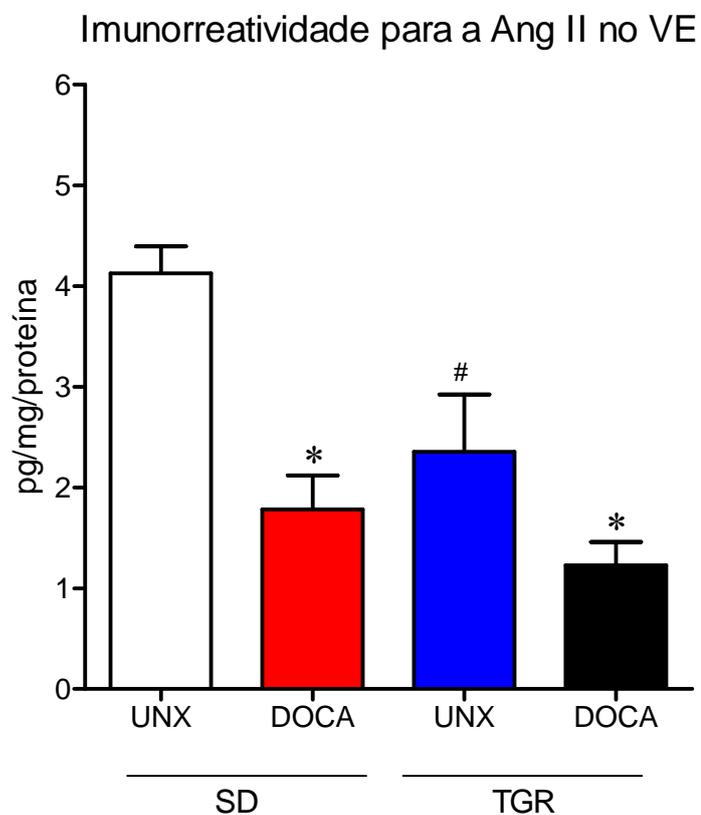


Figura 16 - Níveis de Ang II no VE de animais SD e TGR após 30 dias de hipertensão DOCA-Sal ou uninefrectomia medidos por RIE após extração em colunas de C₁₈. SD-UNX (n=4); SD-DOCA (n=6); TGR-UNX (n=5); TGR-DOCA (n=5). Os dados representam a média \pm EPM. * $p < 0,01$ vs respectivo UNX; # $p < 0,01$ vs SD-UNX (One-way ANOVA seguido de Newman - Keuls).

4.6. Análise da Expressão do *mRNA* dos componentes do SRA no VE

4.6.1. ECA 2

A Figura 17 mostra os resultados da expressão dos níveis de *mRNA* para a ECA 2 no VE analisados por RT-PCR em tempo real. A expressão do *mRNA* para a ECA 2 está aumentada nos animais TGR-UNX ($2,493 \pm 0,28$ U.R.) quando comparados com os animais SD-UNX ($1,00 \pm 0,23$ U.R.; $p < 0,05$). A indução da HA DOCA-Sal reduziu a expressão do *mRNA* para a ECA 2 nos animais TGR-DOCA ($1,179 \pm 0,23$ vs $2,493 \pm 0,28$ U.R.; nos TGR-UNX; $p < 0,05$), enquanto no grupo SD-DOCA a HA não alterou a expressão desta enzima ($1,398 \pm 0,28$ vs $1,00 \pm 0,23$ U.R.; nos SD-UNX; Figura 17).

4.6.2. ECA

A Figura 18 mostra os resultados da expressão dos níveis de *mRNA* para a ECA no VE analisados por RT-PCR em tempo real. A HA DOCA-Sal reduziu a expressão do *mRNA* para a ECA no VE dos ratos TGR-DOCA ($0,463 \pm 0,10$ vs $0,928 \pm 0,22$ U.R.; nos TGR-UNX; $p < 0,05$). Os animais SD-DOCA ($0,997 \pm 0,16$ U.R.) não apresentaram diferença na expressão desta enzima em relação aos SD-UNX ($1,00 \pm 0,20$ U.R.). A expressão do *mRNA* para a ECA foi menor nos ratos TGR-DOCA ($0,463 \pm 0,10$ U.R.) em relação aos ratos SD-DOCA ($0,997 \pm 0,16$ U.R.; $p < 0,05$). Não houve diferença na expressão do *mRNA* para a ECA entre os animais SD-UNX ($1,00 \pm 0,20$ U.R.) e TGR-UNX ($0,928 \pm 0,22$ U.R.; Figura 18).

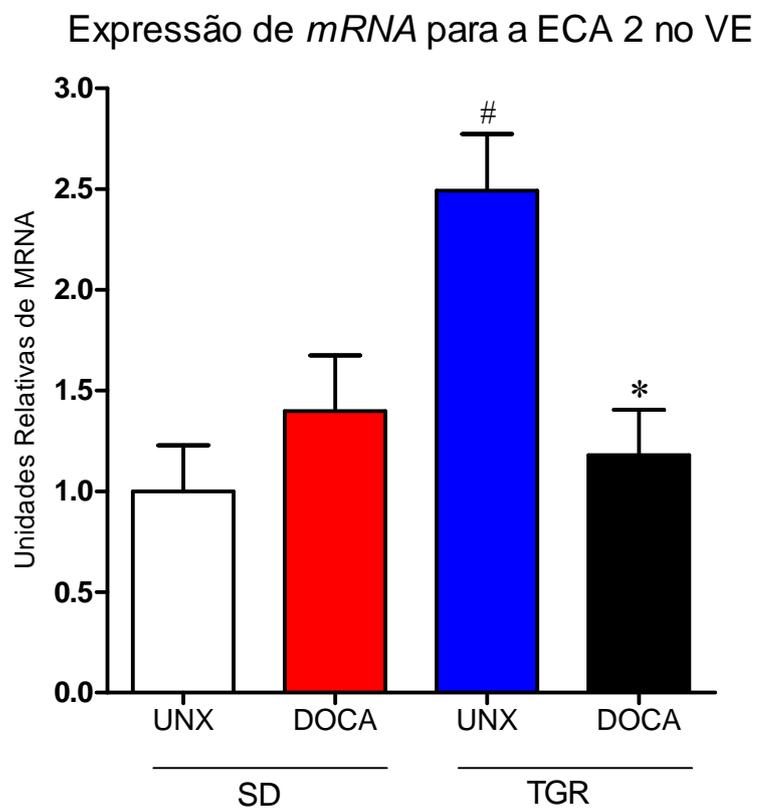


Figura 17 - Expressão do *mRNA* para a ECA 2 analisada por Real Time RT-PCR em amostras de VE de animais SD e TGR após 30 dias de hipertensão DOCA-Sal ou uninefrectomia. SD-UNX (n=5); SD-DOCA (n=8); TGR-UNX (n=6); TGR-DOCA (n=3). Os resultados estão apresentados como média ± EPM. # $p < 0,01$ vs SD-UNX; * $p < 0,05$ vs TGR-UNX (teste t de Student).

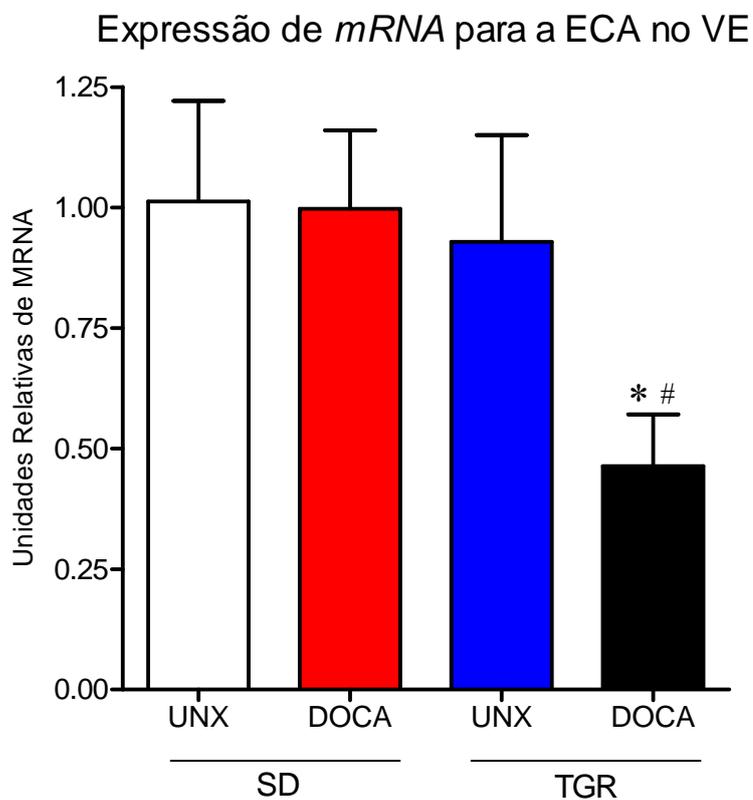


Figura 18 - Expressão do *mRNA* para a ECA analisada por Real Time RT-PCR em amostras de VE de animais SD e TGR após 30 dias de hipertensão DOCA-Sal ou uninefrectomia. SD-UNX (n=4); SD-DOCA (n=4); TGR-UNX (n=5); TGR-DOCA (n=6). Os resultados estão apresentados como média \pm EPM. # $p < 0,05$ vs TGR-UNX; $p < 0,05$ vs SD-DOCA (teste t de Student).

4.6.3. Receptor *Mas*

A Figura 19 mostra os resultados da expressão dos níveis de *mRNA* do receptor *Mas* no VE analisados por RT-PCR em tempo real. Após a indução da HA, os animais TGR-DOCA apresentaram uma redução da expressão do *mRNA* para o receptor *Mas* ($0,649 \pm 0,09$ vs $1,088 \pm 0,18$ U.R.; nos TGR-UNX; $p < 0,05$). Por outro lado, a HA não alterou a expressão deste receptor nos animais SD-DOCA ($0,850 \pm 0,13$ vs $1,00 \pm 0,21$ U.R.; nos SD-UNX). Não houve diferença na expressão para o receptor *Mas* entre os grupos controles SD ($1,00 \pm 0,21$ U.R.) e TGR ($1,088 \pm 0,18$ U.R.; Figura 19).

4.6.4. Receptor AT_1

A Figura 20 mostra os resultados da expressão dos níveis de *mRNA* para o receptor AT_1 no VE analisados por RT-PCR em tempo real. A HA DOCA-Sal não alterou a expressão do receptor AT_1 nos animais SD-DOCA ($0,914 \pm 0,27$ vs $1,00 \pm 0,15$ U.R.; nos SD-UNX) e TGR-DOCA ($0,856 \pm 0,15$ vs $0,786 \pm 0,14$ U.R.; nos TGR-UNX). Não foi encontrada diferença significativa na expressão deste receptor entre os animais SD ($1,00 \pm 0,15$ U.R.) e TGR ($0,786 \pm 0,14$ U.R.) em condições basais (Figura 20).

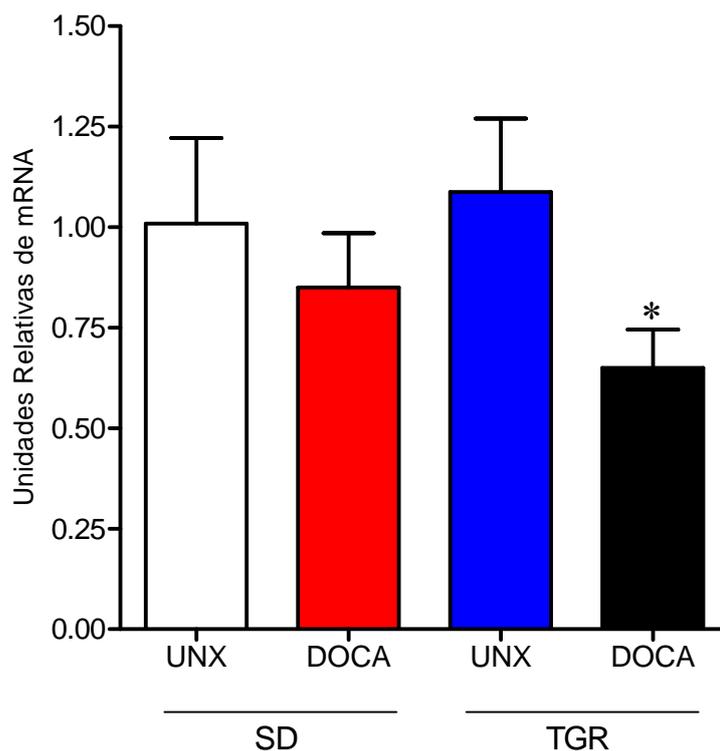
Expressão de *mRNA* para o receptor *Mas* no VE

Figura 19 - Expressão do *mRNA* para o receptor *Mas* analisada por Real Time RT-PCR em amostras de VE de animais SD e TGR após 30 dias de hipertensão DOCA-Sal ou uninefrectomia. SD-UNX (n=8); SD-DOCA (n=9); TGR-UNX (n=10); TGR-DOCA (n=10). Os resultados estão apresentados como média ± EPM. * $p < 0,05$ vs TGR-UNX (teste t de Student).

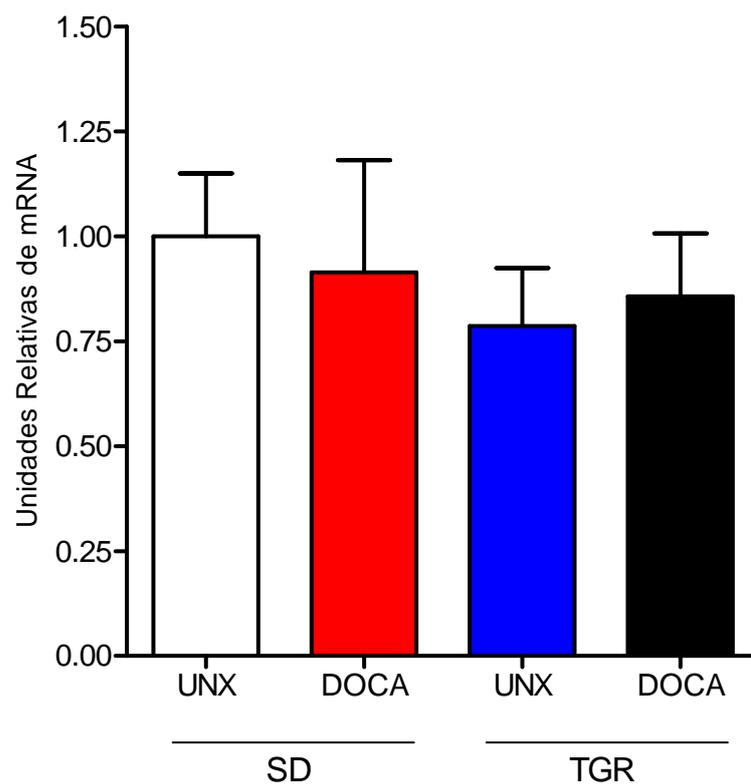
Expressão de *mRNA* para o receptor AT_1 no VE

Figura 20 - Expressão do RNAm para o receptor AT_1 analisada por Real Time RT-PCR em amostras de VE de animais SD e TGR após 30 dias de hipertensão DOCA-Sal ou uninefrectomia. SD-UNX (n=7); SD-DOCA (n=6); TGR-UNX (n=7); TGR-DOCA (n=7). Os resultados estão apresentados como média \pm EPM.

4.7. Resumo dos Resultados

1 – Os animais TGR-DOCA apresentaram uma atenuação da hipertensão arterial em relação aos animais SD-DOCA durante todo o período avaliado. Além disso, os TGR-DOCA se tornaram hipertensos somente a partir do 20^o dia de indução da hipertensão comparado com o respectivo controle, enquanto nos SD-DOCA a PAS aumentou a partir do 10^o dia.

2 – Após a hipertensão arterial, os animais SD-DOCA apresentaram um aumento da fração de ejeção (FE) e fração de encurtamento (ΔD %) comparado aos animais SD-UNX, enquanto os animais TGR-DOCA não apresentaram diferença nestes parâmetros em relação aos animais TGR-UNX.

3 – A hipertensão arterial induziu uma redução da relação Aorta/AE e um aumento do tempo de relaxamento isovolumétrico nos animais SD-DOCA, enquanto que nos animais TGR-DOCA estes parâmetros não foram alterados após a hipertensão arterial.

4 – Os animais SD-DOCA apresentaram um aumento da diferença percentual de espessamento do septo interventricular na sístole e diástole (SIV%), assim como da espessura relativa da parede (ERP) em relação ao seu controle. Em contrapartida, os animais TGR-DOCA apresentaram um aumento da diferença percentual de espessamento da parede posterior (PPVE%) em relação aos animais TGR-UNX.

5 - Os animais TGR-UNX apresentaram a relação E/A maior comparado aos SD-UNX. Após a hipertensão arterial, os animais TGR-DOCA apresentaram a relação E/A menor que os TGR-UNX.

6 – Os animais SD-DOCA e TGR-DOCA não apresentaram diferenças no diâmetro do VE no final da diástole (VEDIA), velocidade de encurtamento circunferencial (VEC), débito cardíaco (DC) e frequência cardíaca (FC).

7 - Após a hipertensão arterial, os animais TGR-DOCA não apresentaram diferença na relação peso VE/comprimento da tíbia em relação aos TGR-UNX, enquanto que os ratos SD-DOCA apresentaram um aumento desta relação, comparados ao seu controle. A relação peso VE/comprimento da tíbia foi menor nos animais TGR-DOCA em relação aos animais SD-DOCA.

8 - Os animais TGR-DOCA não apresentaram diferenças na expressão do *mRNA* para os colágenos do tipo I e III no VE, enquanto que nos ratos SD-DOCA houve um aumento da expressão do *mRNA* para o colágeno I e III após a hipertensão arterial. Os animais TGR-DOCA apresentaram ainda uma menor expressão do *mRNA* para os colágenos do tipo I e III no VE em relação aos SD-DOCA.

9 - Como esperado, os ratos TGR-UNX apresentaram um aumento dos níveis plasmáticos de Ang-(1-7) quando comparados com os animais SD-UNX. A hipertensão arterial reduziu os níveis deste peptídeo apenas nos animais TGR-DOCA.

10 - A hipertensão arterial reduziu os níveis plasmáticos de Ang II nos animais SD-DOCA e TGR-DOCA.

11 - Após a hipertensão arterial, os animais TGR-DOCA apresentaram um aumento de aproximadamente 2,5 vezes nos níveis de Ang-(1-7) no VE em relação aos TGR-UNX, enquanto nenhuma diferença foi observada nos níveis deste peptídeo no VE dos ratos SD-DOCA. Os animais TGR-DOCA apresentaram níveis maiores de Ang-(1-7) no VE em relação aos SD-DOCA.

12 - Os animais TGR-UNX apresentaram menores níveis de Ang II no VE em relação aos animais SD-UNX. Após a hipertensão arterial os animais SD-DOCA e TGR-DOCA apresentaram uma redução dos níveis de Ang II no VE.

13 - Os animais TGR-UNX apresentaram maior expressão do *mRNA* para a ECA 2 no VE em relação aos animais SD-UNX. A hipertensão arterial induziu uma redução da expressão do *mRNA* para a ECA 2 no VE dos animais TGR-DOCA, enquanto nenhuma alteração foi observada nos animais SD-DOCA.

14 - A expressão do *mRNA* para a ECA no VE dos ratos TGR-DOCA foi menor após a hipertensão arterial em relação aos ratos TGR-UNX, enquanto que nos animais SD-DOCA esta expressão não alterou em relação aos SD-UNX. A expressão do *mRNA* para a ECA foi menor nos ratos TGR-DOCA em relação aos ratos SD-DOCA.

15 - Após a hipertensão arterial, os animais TGR-DOCA apresentaram uma redução da expressão do *mRNA* para o receptor *Mas* no VE em relação ao seu controle. A hipertensão arterial não induziu diferença na expressão deste receptor no VE dos animais SD-DOCA.

16 - A hipertensão arterial não alterou a expressão do receptor AT_1 no VE dos animais SD-DOCA e TGR-DOCA.

5. DISCUSSÃO

O presente estudo mostra que ratos TGR que expressam uma proteína de fusão produtora de Ang-(1-7) apresentam uma atenuação do desenvolvimento da hipertensão arterial, disfunção ventricular sistólica e diastólica e remodelamento cardíaco, após a indução do modelo de hipertensão DOCA-Sal. Estes efeitos foram acompanhados de um aumento dos níveis cardíacos de Ang-(1-7), observados pela primeira vez no modelo de hipertensão DOCA-Sal.

Interessantemente, a hipertensão arterial induziu nos ratos transgênicos alterações diferenciais nos níveis plasmáticos e cardíacos de Ang-(1-7) após em comparação aos ratos SD. O desenvolvimento da hipertensão DOCA-Sal induziu nos ratos TGR uma redução dos níveis elevados de Ang-(1-7) no plasma e produziu um aumento de aproximadamente 2,5 vezes nos níveis desse peptídeo no coração. Sendo assim, a atenuação dos efeitos deletérios cardíacos desencadeados pela hipertensão arterial nos ratos TGR parece ser decorrente de um aumento dos níveis de Ang-(1-7) no coração e não apenas pelos níveis aumentados desse peptídeo na circulação.

A análise do desenvolvimento da hipertensão arterial mostrou que os ratos TGR apresentaram menores níveis de pressão arterial sistólica (PAS) durante todo o período avaliado. Além disso, os ratos TGR tornaram-se hipertensos apenas a partir do 20^o dia de indução da hipertensão, enquanto os animais SD já apresentaram um aumento significativo da pressão arterial no 10^o dia avaliado. A atenuação da hipertensão DOCA-Sal nos ratos TGR está de acordo com achados que mostram uma ação antihipertensiva da Ang-(1-7) em animais hipertensos (Braga e cols.,

2002). Alguns estudos mostram que a infusão crônica de Ang-(1-7) promoveu uma atenuação da hipertensão arterial induzida pelo sal, assim como preveniu o desenvolvimento de hipertensão severa em animais hipertensos tratados com L-NAME (Eatman e cols., 2001; Benter e cols., 2005). Além disso, os níveis de Ang-(1-7) circulante aumentam durante o tratamento com drogas anti-hipertensivas, tais como inibidores de ECA e antagonistas de receptor AT₁ e, mais importante, parte do efeito anti-hipertensivo destas drogas é reduzido quando se bloqueia o receptor de Ang-(1-7), *Mas* (Iyer e cols., 1998). Vários trabalhos mostram que a Ang-(1-7) exerce efeito vasodilatador em diferentes leitos vasculares (Brosnihan e cols., 1996; de Paula e cols., 1995). Mais recentemente, Sampaio e cols. (2003) e Botelho-Santos (2007) mostraram que o aumento dos níveis de Ang-(1-7), *in vivo*, produz redução da resistência periférica total em decorrência do efeito vasodilatador em diferentes leitos vasculares. É possível que este seja um dos mecanismos pelos quais os níveis aumentados de Ang-(1-7) tenham atenuado o aumento da PA após a indução da HA DOCA-Sal.

Já está bem definido na literatura que a indução da hipertensão arterial pela administração de mineralocorticóides, juntamente com o aumento da carga de sal, é acompanhada de uma redução do SRA circulante (Katz e cols., 2000; Ogawa e cols., 1999). Outros estudos mostram que a administração de inibidores de ECA e antagonistas do receptor AT₁ não altera os níveis de pressão arterial no modelo de HA DOCA-Sal (Trippodo e cols., 1995; Katz e cols., 2000). Os ratos hipertensos SD e TGR apresentaram um menor nível de Ang II plasmática em relação ao seu respectivo controle, o que sugere que o aumento da pressão arterial observado nestes animais não é dependente do SRA circulante. Além da queda da Ang II, a hipertensão DOCA-Sal induziu nos ratos TGR uma redução dos níveis de Ang-(1-7)

circulante para valores semelhantes aos do SD. Mesmo assim, estes animais apresentaram uma atenuação do desenvolvimento da hipertensão arterial sugerindo que outros mecanismos, muito provavelmente relacionados com os níveis teciduais dos peptídeos angiotensinérgicos estejam envolvidos na atenuação da PA nos ratos TGR-DOCA.

Existem evidências na literatura de que o modelo de hipertensão DOCA-Sal tem como característica um aumento da atividade do SRA central (Schenk e cols., 1992; Weyhenmeyer e cols., 1985). Alguns estudos mostram que a hipertensão DOCA-Sal induz uma maior expressão do receptor AT_1 e aumento da atividade da renina em áreas centrais envolvidas com o controle da pressão arterial (Park e cols.; 2001; Basso e cols., 1981). Outros estudos mostram que o aumento da osmolaridade plasmática é essencial para a manutenção dos níveis elevados de pressão arterial no modelo de HA DOCA-Sal, a partir de uma ação central estimulando a liberação de vasopressina e ativação da atividade simpática (O'Donoghue e cols., 2006ab). Além disso, a administração do DOCA em ratos induz um comportamento hedônico dependente da ingestão de sal (Morris e cols., 2006). Em contrapartida, estudo realizado em nosso laboratório mostrou que ratos TGR(A1-7)3292 apresentaram redução do volume urinário acompanhado de aumento da osmolaridade urinária em condições basais (Ferreira e cols., 2006). No entanto, quando estes animais foram submetidos a ingestão de sal (8%), o volume e a osmolaridade urinária foram restabelecidos, apesar destes animais apresentarem uma menor ingestão de água (Ferreira e cols., 2004). Sendo assim, podemos levantar a hipótese de que a atenuação da hipertensão arterial nos ratos TGR pode estar relacionada com um menor apetite ao sódio durante o desenvolvimento da hipertensão DOCA-Sal e ainda com uma melhora no balanço do sódio. Estes efeitos

podem ser decorrentes de um efeito central do aumento sustentado de Ang-(1-7) sobre as ações dos mineralocorticóides, ou até por uma ação local da Ang-(1-7) sobre a função renal. Contudo, outros estudos precisam ser realizados para verificar se a atenuação da hipertensão DOCA-Sal nos ratos TGR está relacionada a estas alterações.

A redução dos níveis plasmáticos de Ang-(1-7) nos ratos TGR-DOCA foi acompanhada de maiores níveis de Ang-(1-7) no tecido cardíaco. No entanto, o aumento de Ang-(1-7) no VE só foi observado nos ratos TGR-DOCA. Além da produção local de Ang-(1-7) no coração, alguns estudos mostram um papel protetor da Ang-(1-7) no remodelamento cardíaco. Estudos *in vitro* mostram que a Ang-(1-7) previne os efeitos do remodelamento em fibroblastos cardíacos (Iwata e cols., 2005; Diaz-Aray e cols., 2005) e em cardiomiócitos (Tallant e cols., 2005). Outros estudos mostram que, *in vivo*, a Ang-(1-7) pode atenuar a fibrose intersticial cardíaca presente em diferentes modelos de cardiopatias (Loot e cols., 2002; Santos e cols., 2004; Grobe e cols., 2007a; Ferreira e cols., 2007b). Em nosso estudo foi observado que, após a hipertensão DOCA-Sal, os ratos SD apresentaram um aumento da expressão de *mRNA* para o colágeno I e III no VE quando, enquanto que a expressão destes colágenos não foi alterada nos animais TGR. Além disso, a expressão dos colágenos cardíacos foi menor nos ratos TGR-DOCA quando comparados aos SD-DOCA. Sendo assim, esses dados, conjuntamente com estudos já existentes na literatura, sugerem que a Ang-(1-7) pode influenciar a regulação dos componentes da matriz intersticial no tecido cardíaco.

A Ang-(1-7) pode reduzir o aumento da deposição de colágeno que ocorre em resposta à indução de hipertensão arterial por meio de diferentes mecanismos. Ela pode inibir diretamente a secreção de colágeno ou a ativação de fibroblastos

(Iwata e cols., 2005; Grobe e cols.; 2007b), assim como pode inibir a ação de vários fatores pró-fibróticos como a norepinefrina, TGF- β , endotelina, bem como as ações da Ang II (Grobe e cols., 2006). Além disso, a Ang-(1-7) possui efeitos opostos e antagônicos às ações da Ang II sobre a regulação da transcrição de metaloproteases e inibidores de metaloproteases presentes na matriz intersticial de cultura de células cardíacas (Pan cols., 2008). Desta forma, já está bem definido na literatura que a Ang II, via seu receptor AT₁, induz a produção e secreção de colágeno, promovendo um acúmulo de tecido fibroso intersticial no coração (Lijnen e cols., 2001; Kim e cols., 1994) e que a Ang-(1-7) pode contra-regular estas ações pró-fibróticas da Ang II (Iwata e cols., 2005).

Os resultados deste estudo mostraram uma queda da concentração de Ang II no tecido cardíaco nos ratos SD após a hipertensão DOCA-Sal, sugerindo que outros mecanismos estão envolvidos com o aumento da expressão do *mRNA* de proteínas da matriz extracelular observada nos animais SD-DOCA. Katz e cols. (2000) mostraram uma redução da atividade da renina cardíaca após indução da HA DOCA-Sal em ratos SD, o que sugere uma redução dos níveis cardíacos de Ang II neste modelo de HA. Desta forma, uma das possibilidades que poderia explicar o aumento da fibrose intersticial nestes animais, mesmo frente a redução dos níveis locais da Ang II no tecido cardíaco, seria por uma ação direta dos mineralocorticóides sobre o remodelamento cardíaco. Estudos *in vitro* mostram que o mineralocorticóide estimula o aumento da expressão gênica para o colágeno I e III (Brilla e cols., 1994), assim como a síntese de colágeno, em fibroblastos cardíacos de rato adulto (Brilla e cols, 2000). Além disso, o uso do antagonista do receptor para mineralocorticóide preveniu a produção de fibrose cardíaca por mecanismos independentes da sobrecarga pressórica, efeito não observado pela administração do

Losartan (Mill e cols., 2006). Outros estudos sugerem uma interação entre a Ang II e mineralocorticóides, de forma que a aldosterona pode potencializar os efeitos pró-fibróticos da Ang II, aumentando os níveis de *mRNA* e densidade do receptor AT₁ no coração (Silvestre e cols., 1995; Robert e cols., 1999). O mecanismo responsável pelo aumento da expressão de colágenos no coração dos ratos SD-DOCA ainda não está bem esclarecido na literatura. Outros estudos com este modelo de hipertensão ainda precisam ser realizados para uma melhor compreensão da interação entre o SRA e demais sistemas envolvidos com o processo fibrótico no tecido cardíaco. Além disso, seria necessário investigar se a Ang-(1-7) pode alterar os níveis locais de mineralocorticóides ou interferir com as ações destes.

Existem evidências na literatura de que o efeito cardioprotetor da Ang-(1-7) pode ser mediado pelo seu papel preventivo sobre o remodelamento cardíaco em resposta a diferentes cardiomiopatias (Loot e cols., 2002; Zisman e cols., 2003). Vários estudos têm mostrado o efeito da Ang-(1-7) na função cardíaca (Averill e cols., 2003; Ferreira e cols., 2007). A disfunção cardíaca que se observa em camundongos com deleção genética para a ECA2 e receptor *Mas* (Crackower e cols., 2002; Santos e cols., 2006) ilustra o papel da Ang-(1-7). De acordo com estes achados, as análises ecocardiográficas realizadas no presente estudo mostraram que, após a hipertensão DOCA-Sal, os ratos TGR apresentaram uma atenuação da disfunção diastólica quando comparados aos SD. A disfunção diastólica pode estar relacionada com uma alteração dos componentes elásticos que acompanham a fibrose intersticial cardíaca (Brilla e cols., 2000; Ichiara e cols., 2002; Shapiro e cols., 2008). Os animais SD-DOCA tiveram uma redução da relação diâmetro da Aorta/AE e um aumento do tempo de relaxamento isovolumétrico (TRIV) quando comparados ao seu controle. A redução da relação Aorta/AE reflete um maior

volume residual presente no AE em decorrência de um prejuízo no relaxamento ventricular, enquanto o aumento do TRIV indica um comprometimento do relaxamento ventricular no início da diástole, possivelmente devido à maior tensão do tecido cardíaco. Os ratos TGR não apresentaram alteração na função diastólica após a hipertensão, provavelmente por não apresentarem sinais de fibrose cardíaca, sugerindo que a Ang-(1-7) pode exercer um efeito benéfico sobre os mecanismos relacionados com o relaxamento ventricular, possivelmente a partir da sua influência sobre os níveis de colágenos cardíacos.

A hipertensão DOCA-Sal não alterou nos ratos TGR os parâmetros relacionados com a função sistólica, enquanto que nos ratos SD foi observado um aumento da fração de ejeção (FE) e da fração de encurtamento ($\Delta d\%$). O aumento observado nestes parâmetros deve estar relacionado com a hipertrofia cardíaca e mostra um hiperdinamismo do VE destes animais em resposta à indução da hipertensão arterial, sugerindo que os ratos SD ainda estejam em uma fase compensada da função cardíaca. A ausência de disfunção sistólica pode estar relacionada com a duração da hipertensão arterial. Estudo realizado por Sun e cols., (2005) mostrou que a administração de DOCA por um período de 12 semanas promoveu uma redução da FE em camundongos. Desta forma, pode-se sugerir que um tratamento mais prolongado, em uma fase mais avançada da hipertensão, os ratos SD poderiam entrar em um quadro de insuficiência cardíaca.

Estudos já mostraram que a Ang-(1-7) reduz a incidência e duração das arritmias de reperfusão (Ferreira e cols., 2001) e que a infusão crônica deste peptídeo atenua o desenvolvimento de insuficiência cardíaca após infarto do miocárdio (Loot e cols., 2002). Além disso, a Ang-(1-7) altera a contratilidade cardíaca em coração isolado de rato TGR(A1-7)3292, melhorando a função pós-

isquêmica (Santos e cols., 2004). Além disso, a Ang-(1-7) melhora a função ventricular sistólica, uma vez que camundongos com deleção genética para o receptor *Mas* apresentaram uma redução da performance cardíaca avaliada pelo exame ecocardiográfico (Santos e cols., 2006). Os nossos resultados complementam e estendem esses resultados, contribuindo para estabelecer o papel da Ang-(1-7) sobre a função cardíaca, mostrando que a Ang-(1-7) pode atenuar a disfunção cardíaca em resposta ao modelo de hipertensão DOCA-Sal.

Uma outra possibilidade para a menor deposição de colágeno e melhora da função cardíaca nos ratos TGR-DOCA, que não pode ser completamente descartada, está relacionada ao fato de que nos ratos TGR-DOCA a carga pressórica (pós-carga) foi menor, ou seja, mesmo atingindo níveis de hipertensão (168 ± 3 mmHg), o aumento da PAS foi de cerca de 35%, enquanto que no SD foi de 50%. Por outro lado, diversos estudos mostram que as ações cardioprotetoras da Ang-(1-7) são aparentemente independentes de alterações da pressão arterial (Santos e cols., 2006; Grobe e cols., 2007; Ferreira e cols., 2007). Grobe e cols. (2006) mostraram que a infusão subcutânea de Ang-(1-7) durante 28 dias em ratos atenuou o remodelamento cardíaco sem alterar o nível de hipertensão arterial. Desta forma, embora os ratos TGR tenham apresentado atenuação na hipertensão arterial, podemos sugerir que a melhora da disfunção e remodelamento cardíaco esteja relacionada ao aumento dos níveis da Ang-(1-7) no VE, e não devido aos menores níveis de PAS observados nos ratos TGR após a hipertensão.

Um outro aspecto que pode estar relacionado a cardioproteção observada nos ratos TGR após a hipertensão DOCA-Sal é que esta linhagem apresenta, em condições basais, uma alteração dos componentes do SRA cardíaco. Nossos resultados mostraram que os animais TGR apresentam menores níveis basais de

Ang II cardíaca, associado a uma maior expressão de *mRNA* para a ECA2 no VE, o que explicaria o aumento de 3 vezes da relação Ang(1-7)/Ang II no VE dos ratos TGR. Estudo realizado em nosso laboratório mostrou que, além dessas alterações cardíacas, os ratos TGR apresentam uma redução da expressão *mRNA* de angiotensinogênio no VE, o que pode levar a uma menor formação de Ang II no tecido cardíaco (Nadu e cols., 2008). Esses dados estão de acordo com o estudo de Mendes e cols. (2005), mostrando que a infusão subcutânea de Ang-(1-7) promoveu uma redução importante dos níveis de Ang II no coração, acompanhada de aumento da expressão de ECA2 no coração. Por outro lado, Ishiyama e cols. (2004) mostraram que a Ang II pode reduzir a expressão de ECA2 em células cardíacas e que a Ang-(1-7) não apresenta efeito direto sobre a expressão de ECA2. No entanto, em astrócitos, a Ang-(1-7) pode reduzir o efeito inibitório da Ang II sobre a expressão da ECA2 (Gallagher e cols., 2006). Desta forma, esses dados sugerem que o aumento crônico de Ang-(1-7) nos ratos TGR pode induzir redução dos níveis de angiotensinogênio e conseqüentemente os níveis de Ang II, que por sua vez resultam em aumento da expressão de ECA 2 e Ang-(1-7) no coração.

Após o desenvolvimento da hipertensão, os ratos TGR apresentaram alterações distintas no metabolismo dos peptídeos angiotensinérgicos cardíacos. A hipertensão DOCA-Sal induziu nos ratos TGR um aumento de aproximadamente 2,5 vezes nos níveis de Ang-(1-7) no VE e em uma queda em menor magnitude dos níveis já reduzidos de Ang II no tecido cardíaco, o que resultou em um aumento de cerca de 8 vezes na relação Ang-(1-7)/ Ang II no VE dos ratos TGR. Interessantemente, após a hipertensão foi observado nos ratos TGR uma redução da expressão de ECA2 a níveis similares aos do SD. A redução da expressão da ECA2 foi acompanhada de queda da expressão da ECA no VE dos ratos TGR-DOCA. Em

contrapartida, a hipertensão nos animais SD induziu apenas uma redução dos níveis de Ang II no coração, sendo esse um resultado esperado diante da indução da hipertensão DOCA-Sal (Katz e cols., 2000).

Dentre as modificações observadas nos TGR após a hipertensão, a compreensão de quais são os mecanismos de formação da Ang-(1-7) no VE é de grande relevância, uma vez que o aumento deste peptídeo parece estar relacionado com a atenuação da disfunção e fibrose cardíaca após a hipertensão. É importante ressaltar que a Ang-(1-7) é hidrolisada pela ECA, resultando em um peptídeo destituído de efeito biológico. A redução da expressão da ECA no VE dos ratos TGR-DOCA pode estar relacionada com uma menor degradação da Ang-(1-7). Além disso, existem evidências de que a Ang-(1-7) tem um efeito inibitório sobre a atividade da ECA (Deddish e cols., 1998), o que favorece ainda mais o acúmulo deste peptídeo. Os menores níveis de Ang II no VE dos ratos TGR também pode ser um reflexo da menor expressão de ECA no coração após a hipertensão. Alguns estudos sugerem que a ECA2 é a principal enzima envolvida com a formação de Ang-(1-7) a partir da Ang II (Crackower e cols., 2002; Zisman e cols., 2003). No entanto, a expressão de ECA2 reduziu nos TGR-DOCA, juntamente com o seu principal substrato, a Ang II. Sendo assim, embora não tenham sido analisados os níveis de Ang I no tecido cardíaco dos ratos TGR-DOCA, a redução da expressão das enzimas conversoras de angiotensinas no VE dos ratos TGR, sugere que o precursor para a formação de Ang-(1-7) nestes animais seja a Ang I.

Alguns trabalhos sugerem a existência de vias alternativas para a formação de Ang-(1-7) no coração. Campbell e cols. (2004) sugerem a ação de endopeptidases na formação de Ang-(1-7) no tecido cardíaco a partir da Ang I, por uma via independente da ECA2. Campbell e cols. (2007) mostraram que a Ang-(1-

7) pode ser formada através da NEP a partir da Ang-(1-12). Recentemente, a Ang-(1-12) foi identificada em diferentes tecidos de ratos, bem como no coração (Nagata e cols., 2006), sugerindo a possibilidade deste peptídeo representar um novo precursor para as angiotensinas. Garabelli e cols., (2008) mostraram que a carboxipeptidase A, e não a ECA2, está envolvida com a formação de Ang-(1-9) a partir da Ang I, em coração de camundongos. Dessa forma, estudos futuros deverão ser realizados para identificar quais enzimas estão relacionadas com a formação de Ang-(1-7) no VE dos ratos TGR submetidos à hipertensão DOCA-Sal.

Vale ressaltar que no presente estudo avaliou-se a expressão do *mRNA* para a ECA e ECA2 e não a atividade ou concentração destas enzimas. Assim, ainda não podemos descartar a possibilidade de que a alteração na expressão do *mRNA* não esteja refletindo a expressão das proteínas, de forma que a formação de Ang-(1-7) pode estar ocorrendo através da ação da ECA2. Uma outra possibilidade que poderia explicar o aumento de Ang-(1-7) no VE dos ratos TGR, ainda a ser explorada, é que a indução da hipertensão DOCA-Sal poderia alterar a expressão do transgene no coração.

Sabe-se que o aumento dos níveis de angiotensinas teciduais envolve formação local e/ou captação do peptídeo da circulação. Katz e cols. (1997) sugerem que a Ang II pode ser captada da circulação para diferentes tecidos, o que contribuiria para o aumento local dos níveis deste peptídeo. Outros estudos mostram que a captação de Ang II da circulação para o tecido renal é mediada pelo receptor AT₁ a partir de sua internalização (Li e cols., 2008; Ortiz e cols., 2008). Esse dado explicaria a ausência da rápida degradação da Ang II por endoproteases teciduais (Katz e cols., 1997). Diante da captação de Ang II do plasma para o tecido, não podemos descartar a possibilidade da captação da Ang-(1-7) da

circulação para o tecido cardíaco estar envolvida com o aumento dos níveis deste peptídeo no VE dos ratos TGR-DOCA.

Diante do aumento dos níveis de Ang-(1-7) no VE dos ratos TGR passamos a investigar a expressão do *mRNA* para o receptor *Mas* nesses animais após a hipertensão. Interessantemente, a expressão do receptor *Mas* foi menor nos ratos TGR após a hipertensão. Em condições basais não observamos diferença na expressão do *mRNA* para o receptor *Mas* entre os ratos TGR e SD. Em contrapartida, a hipertensão não alterou a expressão do *mRNA* para o receptor *Mas* nos ratos SD. Vários estudos mostram que a proteína *Mas* é o principal receptor para mediar as ações da Ang-(1-7) (Santos e cols., 2003; Ferreira e cols., 2007). O receptor *Mas* parece mediar também todas as ações descritas para a Ang-(1-7) no coração (Castro e cols., 2006; Tallant e cols., 2005). Os resultados de nosso estudo sugerem que o aumento acentuado nos níveis de Ang-(1-7) nos ratos TGR-DOCA tenha induzido o *downregulation* do receptor *Mas*. Estudos recentes sugerem a existência de um diferente subtipo de receptor para a Ang-(1-7) (Silva e cols., 2006). Estudos futuros serão necessários para avaliar a existência de outro subtipo de receptor para a Ang-(1-7) no coração e se há alterações desses níveis após a hipertensão arterial.

A expressão cardíaca do receptor AT₁ não alterou nos ratos SD após a HA DOCA-Sal, sugerindo que este receptor não está envolvido com as alterações cardíacas observadas nestes animais. Embora existam evidências de que o receptor AT₁ participe dos mecanismos que envolvem o remodelamento cardíaco observado na HA DOCA-Sal ou induzida por mineralocorticóides (Nisshikawa e cols., 1998; Johar e cols. 2006), Kim e cols. (1994) observaram que a administração de antagonista de receptor AT₁ não reduz a fibrose cardíaca em ratos submetidos a este

modelo de hipertensão. Desta forma, ainda não está claro na literatura o envolvimento do receptor AT₁ com as alterações cardíacas observadas na HA DOCA-Sal. Nossos resultados mostraram ainda que a expressão do receptor AT₁ não diferiu entre os animais TGR-DOCA e SD-DOCA, sugerindo que a Ang-(1-7) não alterou a expressão deste receptor após a HA. De acordo com os nossos achados, Grobe e cols. (2007) mostraram que a infusão subcutânea de Ang-(1-7) reduz a fibrose cardíaca sem alterar os níveis do receptor AT₁ no coração de ratos tratados com Ang II. Em contrapartida, outros estudos mostraram que a Ang-(1-7) reduz os níveis do receptor AT₁ em células musculares lisas vasculares (Clark e cols.; 2001) e renais (Clark e cols., 2003). Desta forma, estudos subseqüentes bloqueando o receptor AT₁ são necessários para esclarecer a participação deste receptor na HA DOCA-Sal nos animais TGR.

Em síntese, nossos resultados mostram que o aumento crônico de Ang-(1-7) presente nos ratos TGR(A1-7)3292 promoveu um efeito cardioprotetor diante de um quadro de hipertensão arterial. Estes animais apresentaram uma atenuação da hipertensão arterial, remodelamento e disfunção cardíaca após o desenvolvimento do modelo de hipertensão DOCA-Sal. Estes efeitos parecem estar associados a uma alteração específica do SRA cardíaco, de forma a favorecer a formação de Ang-(1-7) no coração.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Averill DB, Ishiyama Y, Chappell MC & Ferrario CM. Cardiac angiotensin-(1-7) in ischemic cardiomyopathy. *Circulation* 106: 2141–2146, 2003.

Bader M, Peters J, Baltatu O, Muller DN, Luft FC, Ganten D. Tissue renin angiotensin systems: new insights from experimental animal models in hypertension research. *J Mol Med.* 102: 79-76 , 2001.

Banerjee I, Yekkala K, Borg TK, Baudino TA. Dynamic interactions between myocytes, fibroblasts, and extracellular matrix. *Ann N Y Acad Sci.* 1080:76-84. 2006.

Basso N, Ruiz P, Mangiarua E, Taquini AC. Renin-like activity in the rat brain during the development of DOC-salt hypertension. *Hypertension* 3(6 Pt 2): II-14-7, 1981

Baudino TA, Carver W, Giles W, Borg TK. Cardiac fibroblasts: friend or foe? *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 291: H1015–H1026, 2006.

Becker LK, Etelvino GM, Walther T, Santos RA, Campagnole-Santos MJ. Immunofluorescence localization of the receptor Mas in cardiovascular-related areas of the rat brain. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 293(3):H1416-24, 2007.

Benter IF, Diz DI, Ferrario CM. Cardiovascular actions of angiotensin(1-7). *Peptides.* 14(4):679-84, 1993.

Benter IF, Yousif MH, Anim JT, Cojocel C & Diz DI. Angiotensin-(1-7) prevents development of severe hypertension and end-organ damage in spontaneously hypertensive rats treated with l-NAME. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 290: H684–H691, 2006.

Botelho-Santos GA, Sampaio WO, Reudelhuber TL, Bader M, Campagnole-Santos MJ & Santos RAS. Expression of an angiotensin-(1-7)-producing fusion protein in rats induced marked changes in regional vascular resistance. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 292: H2485–H2490, 2007.

- Boon JA. Manual of Veterinary Echocardiography. Pennsylvania: Copyright, 1998.
- Braga AN, Silva Lemos M, Silva JR, Fontes WR & Santos RAS. Effects of angiotensins on day-night fluctuations and stress-induced changes in blood pressure. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 282, R1663–R1671, 2002.
- Brosnihan KB, Li P, Ferrario CM. Angiotensin-(1–7) dilates canine coronary arteries through kinins and nitric oxide. *Hypertension*. 27: 523–528, 1996.
- Brosnihan KB, Li P, Tallant EA, Ferrario CM Angiotensin-(1-7): a novel vasodilator of the coronary circulation. *Biol Res*. 31(3):227-34, 1998.
- Brilla CG, Zhou G, Matsubara L, Weber KT. Collagen metabolism anti in cultured adult rat cardiac fibroblasts: response to angiotensin II and aldosterone. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*. 26: 809-820, 1994.
- Brilla CG. Renin-angiotensin-aldosterone system and myocardial fibrosis. *Cardiovasc Res*. 47(1): 1-3, 2000.
- Britto RR, Santos RAS, Fagundes-Moura CR, Khosla MC, Campagnole-Santos. Role of angiotensin-(1-7) in the modulation of the baroreflex in renovascular hypertensive rats. *Hypertension*. 30:549-556, 1997.
- Campagnole-Santos MJ, Diz DI, Santos RA, Khosla MC, Brosnihan KB, Ferrario CM. Cardiovascular effects of angiotensin-(1-7) injected into the dorsal medulla of rats. *Am J Physiol*. 257(1 Pt 2):H324-9, 1989.
- Campagnole-Santos MJ, Diz DI, Ferrario CM. Actions of angiotensin peptides after partial denervation of the solitary tract nucleus. *Hypertension*. 15 suppl I): I-34-I-39, 1990.
- Campagnole-Santos MJ, Heringer SB, Batista EN, Khosla MC, Santos RAS. Diferencial Baroreceptor Reflex Modulation by Centrally Infused Angiotensin Peptides. *American Physiological Society*, 263:R-89-R94, 1992.
- Campbell DJ. The site of angiotensin production. *J Hypertens*. 3: 199-207, 1987.
- Campbell DJ, Zeitz CJ, Esler MD & Horowitz JD. Evidence against a major role for angiotensin converting enzyme-related carboxypeptidase (ACE2) in angiotensin peptide metabolism in the human coronary circulation. *J Hypertens* 22: 1971–1976, 2004.

Carey RM., Siragy HM. Newly recognized components of the rennin-angiotensin system: potential roles in cardiovascular and renal regulation. *Endocr Rev.* 24(3): 261-271, 2003.

Carvalho MB, Duarte FV, Faria-Silva R, Fauler B, da Mata Machado LT, de Paula RD, Campagnole-Santos MJ, Santos RA. Evidence for Mas-mediated bradykinin potentiation by the angiotensin-(1-7) nonpeptide mimic AVE 0991 in normotensive rats. *Hypertension.* 762-7, 2007.

Castro CH, Santos RA, Ferreira AJ, Bader M, Alenina N, Almeida AP. Evidence for a functional interaction of the angiotensin-(1-7) receptor Mas with AT₁ and AT₂ receptors in the mouse heart. *Hypertension.* 46(4): 937-942, 2005.

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.* 80(3): 264-268, 2006

Chancey AL, Brower GL, Peterson JT, Janicki JS. Effects of matrix metalloproteinase inhibition on ventricular remodeling due to volume overload. *Circulation.* 23;105(16):1983-8, 2002.

Chappel MC, Tallant EA, Brosnihan KB, Ferrario CM. Processing of angiotensin peptides by NG108-15 neuroblastoma X glioma hybrid cell line. *Peptides* 22: 375-380, 1990.

CHAPPELL MC, PIRRO NT, SYKES A, FERRARIO CM. Metabolism of angiotensin-(1-7) by Angiotensin-Converting Enzyme. *Hypertension*, 31: 362-367, 1998.

Chappell MC, Modrall JG, Diz DI, Ferrario CM. Novel aspects of the renal renin-angiotensin system: angiotensin-(1-7), ACE2 and blood pressure regulation. *Contrib Nephrol.* 143:77-89, 2004.

Chappell MC, Westwood BM, Pendergrass KD, Jessup JA, Ferrario CM. Distinct processing pathways for the novel peptide angiotensin-(1-12) in the serum and kidney of the hypertensive mRen2.Lewis Rat. *Hypertension.* 50:e139, 2007.

Clark MA, Tallant EA, Diz DI. Downregulation of the AT1A receptor by pharmacologic concentrations of Angiotensin-(1-7). *J Cardiovasc Pharmacol.* 37(4): 437-448, 2001.

Clark MA, Tallant EA, Tommasi E, Bosch S, Diz DI. Angiotensin-(1-7) reduces renal angiotensin II receptors through a cyclooxygenase-dependent mechanism. *J Cardiovasc Pharmacol.* 41(2): 276-283, 2003.

Crackower MA, Oudit GY, Kozieradzki I, Sarao R, Sun H, Sasaki, Hirsch E, Suzuki A, Shioi T, Irie-Sasaki J, Sah R, Cheng HY, Rybin VO, Lembo G, Fratta L, Oliveira-dos-Santos AJ, Benovic JL, Kahn CR, Izumo S, Steinberg SF, Wymann MP, Backx PH, Penninger JM. Angiotensin-converting enzyme 2 is an essential regulator of heart function. *Nature* 417 (6891): 822-828, 2002.

DelliPizzi AM, Hilchey SD, Bell-Quilley CP. Natriuretic action of angiotensin(1-7). *Br J Pharmacol.* 111(1): 1-3, 1994.

De Mello WC. Angiotensin converting enzyme and the arrhythmogenic action of angiotensin I: cardiac cell membrane as a site of angiotensin I conversion. *Regul Pept.* 121(1-3): 83-88, 2004.

Deddish PA, Marcic B, Jackman HL, Wang HZ, Skidgel AR, Erdos EG. N-domain specific substrate and C-domain inhibition of angiotensin-converting enzyme: angiotensin-(1-7) and Keto-ACE. *Hypertension* 31: 912-917, 1998.

Diaz-Aray, G. A., Petrov, V. V., Ragard, R. H. and Lijnen, P. Effect of angiotensin(1-7) on collagen production in cardiac fibroblasts. *Am. J. Hypertens.* 18: 230A, 2005.

Díez-Freire C, Vázquez J, Correa de Adjoulian MF, Ferrari MF, Yuan L, Silver X, Torres R, Raizada MK. ACE2 gene transfer attenuates hypertension-linked pathophysiological changes in the SHR. *Physiol Genomics.* 27(1): 12-19, 2006.

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

Donoghue M, Wakimoto H, Maguire C. T. Heart block, ventricular tachycardia, and sudden death in ACE2 transgenic mice with downregulated connexins. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 35, 1043-1053, 2003.

Dostal DE & Baker KM. The Cardiac Renin-Angiotensin System. Conceptual, or a Regulator of Cardiac Function? *Circulation Research*, 85: 643-650, 1999.

Dzau VJ. Tissue rennin-angiotensin system: physiologic and pharmacologic implications. Introduction. *Circulation*. 77 (6Pt 2): 11-2, 1988.

Eatman D, Wang M, Socci RR, Thierry-Palmer M, Emmett N, Bayorh MA. Gender differences in the attenuation of salt-induced hypertension by angiotensin (1-7). *Peptides*. 22(6): 927-933, 2001.

Faria-Silva R, Duarte FV, Santos RA. Short-term angiotensin(1-7) receptor MAS stimulation improves endothelial function in normotensive rats. *Hypertension*. 46(4): 948-952, 2005.

Fernandes L, Fortes ZB, Casarini DE, Nigro D, Tostes RC, Santos RA, de Carvalho MH. Role of PGI2 and effects of ACE inhibition on the bradykinin potentiation by angiotensin-(1-7) in resistance vessels of SHR. *Regul Pept*. 15;127(1-3):183-9, 2005.

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

Ferrario CM, Smith RD, Brosnihan B, Chappell MC, Campese VM, Vesterqvist O, Liao WC, Ruddy MC, Grim CE. Effects of omapatrilat on the renin-angiotensin system in salt-sensitive hypertension. *Am J Hypertens*. 15(6):557-64, 2002.

Ferrario CM, Trask AJ, Jessup JA. Advances in biochemical and functional roles of angiotensin-converting enzyme 2 and angiotensin-(1-7) in regulation of cardiovascular function. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 289(6):H2281-90, 2005.

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

Ferreira AJ, Santos RA, Almeida AP. Angiotensin-(1-7) improves the post-ischemic function in isolated perfused rat hearts. *Braz J Med Biol Res*. 35(9):1083-90, 2002.

Ferreira AJ, Pinheiro SV, Castro CH, Silva GAB, Simões e Silva AC, Almeida AP. Renal function in transgenic rats expressing an angiotensin-(1-7)-producing fusion protein. *Regul Pept* 137, 128-133, 2006.

Ferreira AJ, Jacoby BA, Araujo CA, Macedo FA, Silva GAB, Almeida AP. The nonpeptide angiotensin-(1-7) receptor Mas agonist AVE 0991 attenuates heart failure induced by myocardial infarction. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 292: H1113-H1119, 2007a.

Ferreira AJ, Oliveira TL, Castro MC, Almeida AP, Castro CH, Caliari MV. Isoproterenol-induced impairment of heart function and remodeling are attenuated by the nonpeptide angiotensin-(1-7) analogue AVE 0991. *Life Sci* 81, 916-923, 2007b.

Ferreira AJ. Caracterização em nível genômico, bioquímico e fisiológico de um modelo de rato transgênico que superexpressa angiotensina-(1-7). Fisiologia e Biofísica, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2004. 162p.

Fontes MA, Silva LC, Campagnole-Santos MJ, Khosla MC, Guertzenstein PG, Santos RA. Evidence that angiotensin-(1-7) plays a role in the central control of blood pressure at the ventro-lateral medulla acting through specific receptors. *Brain Res.* 665(1):175-80, 1994.

Gallagher PE, Chappell MC, Ferrario CM, Tallant EA. Distinct roles for ANG II and ANG-(1-7) in the regulation of angiotensin-converting enzyme 2 in rat astrocytes. *Am J Physiol Cell Physiol.* 290 (2): C420-426, 2006.

Garabelli PJ, Modrall JG, Penninger JM, Ferrario CM, Chappell MC. Distinct roles for angiotensin-converting enzyme 2 and carboxypeptidase A in the processing of angiotensins within the murine heart. *Exp Physiol.* 93(5):613-21, 2008.

Gómez-Sánchez EP, Zhou M, Gomez-Sanchez CE. Mineralocorticoids, salt and high blood pressure. *Steroids.* 61(4):184-8, 1996.

Goodfriend TL. Angiotensins. A family that grows from within. *Hypertension.* 17(2):139-40, 1991.

Graf K, Graf M, Bossler C, Nlehues J, Schulz KD, Schwelk WA, Fleck E. Degradation of bardiakinin by neutral endopeptidase (EC3 4 2 11) in cultured human endothelial cells. *European Journal of Clinical Chemistry Clin Biochemistry,* 31:267-262, 1993.

Greene LJ, Spadaro AC, Martins AR, Perussi de Jesus WD, Camargo AC. Brain endo-oligopeptidase B: a post-proline cleaving enzyme that inactivates angiotensin I and II. *Hypertension* 4(2): 178-84, 1982.

Grobe JL, Mecca AP, Mao H, Katovich MJ. Chronic angiotensin-(1-7) prevents cardiac fibrosis in DOCA-salt model of hypertension. *American Journal Physiology Heart and Circulation Physiology,* 290: 2417-2423, 2006.

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

Grobe JL, Der Sarkissian S, Stewart JM, Meszaros JG, Raizada MK, Katovich MJ. ACE2 overexpression inhibits hypoxia-induced collagen production by cardiac fibroblasts. *Clin Sci (Lond)*. 113(8):357-64, 2007b.

Gurley SB, Allred A, Le TH, Griffiths R, Mao L, Philip N, Haystead TA, Donoghue M, Breitbart RE, Acton SL, Rockman HA, Coffman TM. Altered blood pressure responses and normal cardiac phenotype in ACE2-null mice. *J Clin Invest*. 116(8): 2218-2225, 2006.

Haack D, Möhring J, Möhring B, Petri M, Hackenthal E. Comparative study on development of corticosterone and DOCA hypertension in rats. *American Journal Physiology*. 233 (5): F403 – F411, 1977.

Heitsch H, Brovkovich S, Malinski T, Wiemer G. Angiotensin-(1-7)-Stimulated Nitric Oxide and Superoxide Release From Endothelial Cells. *Hypertension*. 37(1):72-76, 2001.

Heringer-Whalter SB, Batista EM, Whalter T, Khosla MC, Santos RAS, Campagnole-Santos MJ. Baroreflex improvement in SHR after ACE inhibition involves angiotensin- (1-7). *Hypertension*. 37:1309-1314, 2001.

Huentelman MJ, Grobe JL, Vazquez J, Stewart JM, Mecca AP, Katovich MJ, Ferrario CM, Raizada MK. Protection from angiotensin II-induced cardiac hypertrophy and fibrosis by systemic lentiviral delivery of ACE2 in rats. *Exp Physiol*. 90(5):783-90, 2005.

Ichihara S, Senbonmatsu T, Price E Jr, Ichiki T, Gaffney FA, Inagami T. Angiotensin II type 2 receptor is essential for left ventricular hypertrophy and cardiac fibrosis in chronic angiotensin II-induced hypertension. *Circulation*. 104(3): 346-351, 2001.

Ishiyama Y, Gallagher PE, Averill DB, Tallant EA, Brosnihan KB, Ferrario CM. Upregulation of angiotensin-converting enzyme 2 after myocardial infarction by blockade of angiotensin II receptors. *Hypertension*. 43(5): 970-976, 2004

Iwata M, Cowling RT, Gurantz D, Moore C, Zhang S, Yuan JX, Greenberg BH. Angiotensin-(1-7) binds to specific receptors on cardiac fibroblasts to initiate antifibrotic and antitrophic effects. *American Journal Physiology*, 289: 2356-2363, 2005.

Iyer SN, Ferrario CM, Chappell MC. Vasodepressor actions of angiotensin-(1-7) unmasked during combined treatment with lisinopril e losartan. *Hypertension*, 31: 699-705, 1998.

Iyer SN, Averill DB, Chappell MC, Yamada K, Allred AJ, Ferrario CM Contribution of angiotensin-(1-7) to blood pressure regulation in salt-depleted hypertensive rats. *Hypertension*. 36(3): 417-422, 2000.

Johar S, Cave AC, Narayanapanicker A, Grieve DJ, Shah AM. Aldosterone mediates angiotensin II-induced interstitial cardiac fibrosis via a Nox2-containing NADPH oxidase. *FASEB J*. 20(9): 1546-1548, 2006.

Katwa LC, Campbell SE, Tyagi SC, Lee SJ, Cicila GT, Weber KT. Cultured myofibroblasts generate angiotensin peptides de novo. *J Mol Cell Cardiol*. 29(5):1375-86, 1997.

Katz SA, Opsahl JA, Wernsing SE, Forbis LM, Smith J, Heller LJ. Myocardial renin is neither necessary nor sufficient to initiate or maintain ventricular hypertrophy. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 278(3): R578-586, 2000.

Kim S, Ohta K, Hamaguchi A, Omura T, Yukimura T, Miura K, Inada Y, Wada T, Ishimura Y, Chatani F Role of angiotensin II in renal injury of deoxycorticosterone acetate-salt hypertensive rats. *Hypertension*. 24(2): 195-204, 1994.

Kim S, Iwao H. Molecular and Cellular Mechanisms of Angiotensin II- Mediated Cardiovascular and renal Disease. *Pharmacological review*, 52(1): 11-34, 2001.

Li XC, Zhuo JL. In vivo regulation of AT1a receptor-mediated intracellular uptake of [125I]Val5-ANG II in the kidneys and adrenals of AT1a receptor-deficient mice. *Am J Physiol Renal Physiol* 294: F293–F302, 2008.

Lijnen PJ & Petrov VV . Role of intracardiac reninangiotensin - aldosterone system in extracellular matrixremodeling. *Methods Find Exp Clin Pharmacol* 25, 541–564, 2003.

Linz W, Wiemer G, Gohlke P, Unger T, Scholkens BA. Contribution of Kinins to the cardiovascular actions of angiotensin-converting enzyme inhibitors. *Pharmacological Review*, 47:25-49, 1995.

Loundon M, Bing RF, Thurston H, Swales JD. Arterial wall uptake of rennin and blood pressure control. *Hypertension*. 5: 629-634, 1983.

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

Luque M, Martin P, Marrel N, Fernandez C, Brosnihan KB, Ferrario CM. Effects of captopril related to Increased Levels of prostacyclin and Angiotensin-(1-7) in Essential Hypertension. *Journal of hypertension*. 14:799-805, 1996.

Method D, Vankats JP, Lochard N, Tremblay F, Silversides DW, Reudelhuber TL. Development and Application of a biological peptide pump for the study of the *in vivo* actions of Angiotensin peptides. *American Journal of Hypertension*, 14: 38S-43S, 2001.

Machado RD, Santos RAS & Andrade SP. Opposing actions of angiotensins on angiogenesis. *Life Sci* 66, 67–76, 2000.

Machado RD, Ferreira MA, Belo AV, Santos RA, Andrade SP. Vasodilator effect of angiotensin-(1-7) in mature and sponge-induced neovasculature. *Regul Pept*. 15;107(1-3):105-13, 2002.

Mackins CJ, Kano S, Seyedi N, Schäfer U, Reid AC, Machida T, Silver RB, Levi R. Cardiac mast cell-derived renin promotes local angiotensin formation, norepinephrine release, and arrhythmias in ischemia/reperfusion. *J Clin Invest*. 116(4):1063-70, 2006.

Manabe I, Shindo T, Nagai R. Gene expression in fibroblasts and fibrosis: involvement in cardiac hypertrophy. *Circ Res*. 13;91(12):1103-13, 2002.

Mendes AC, Ferreira AJ, Pinheiro SV & Santos RAS. Chronic infusion of angiotensin-(1–7) reduces heart angiotensin II levels in rats. *Regul Pept* 125: 29–34, 2005.

Mill JG, Milanez MC, Resende MM, Gomes MGS, Leite CM. Spironolactone prevents cardiac collagen proliferation after myocardial infarct in rats. *Clin Exp Pharm Physiol*. 30(10):739-744. 2003.

Mirkovic S, Seymour AM, Fenning A, Strachan A, Margolin SB, Taylor SM, Brown L. Attenuation of cardiac fibrosis by pirfenidone and amiloride in DOCA-salt hypertensive rats. *Br J Pharmacol*. 135(4): 961-968, 2002.

Morris MJ, Na ES, Grippo AJ, Johnson AK. The effects of deoxycorticosterone-induced sodium appetite on hedonic behaviors in the rat. *Behav Neurosci*. 120(3): 571-579, 2006.

Nadu AP, Ferreira AJ, Reudelhuber TL, Bader M, Santos RAS. The isoproterenol-induced increase of cardiac Ang II levels associated with heart hypertrophy is blunted in rats harboring an Angiotensin-(1-7)-producing fusion protein [TGR(A1-7)3292]. *Hypertension* 48, e72, 2006.

Nagata S, Kato J, Sasaki K, Minamino N, Eto T, Kitamura K. Isolation and identification of proangiotensin-12, a possible component of the renin-angiotensin system. *Biochem Biophys Res Commun*. 350:1026-1031, 2006.

Neves LA, Almeida AP, Khosla MC, Campagnole-Santos MJ, Santos RA. Effect of angiotensin-(1-7) on reperfusion arrhythmias in isolated rat hearts. *Braz J Med Biol Res*. 30(6):801-9, 1997.

Nishikawa K. Angiotensin AT₁ receptor antagonism and protection against cardiovascular end-organ damage. *J Hum Hypertens*. 12(5):301-9, 1998.

O'Donoghue TL, Qi Y, Brooks VL. Central action of increased osmolality to support blood pressure in deoxycorticosterone acetate-salt rats. *Hypertension*. 48(4):658-63, 2006a.

O'Donoghue TL, Brooks VL. Deoxycorticosterone acetate-salt rats: hypertension and sympathoexcitation driven by increased NaCl levels. *Hypertension*. 47(4):680-5, 2006b.

Ogawa T, Linz W, Schölkens BA, de Bold AJ. Variable renal atrial natriuretic factor gene expression in hypertension. *Hypertension*. 33(6):1342-7, 1999.

Oliveira DR, Santos RAS, Santos GPF, Khosla MC, Campagnole-Santos MJ. Changes in the baroreflex control of heart rate produced by central infusion of selective angiotensin antagonists in hypertensive rats. *Hypertension*. 27(6): 1284-1290, 1996.

Ortiz RM, Delineating the contributions of AT_{1a} and AT_{1b} receptor-mediated uptake of ANG II in kidneys and adrenals. *Am J Physiol Renal Physiol*. 294: F291–F292, 2008.

Oudit GY, Herzenberg AM, Kassiri Z, Wong D, Reich H, Khokha R. Loss of angiotensin-converting enzyme-2 leads to the late development of angiotensin II dependent glomerulosclerosis. *Am J Pathol*. 168, 1808–1820. 2006.

Oudot A, Vergley C, Ecartot-Laubriet A, Rochette L. Pharmacological concentration of angiotensin-(1–7) activates NADPH oxidase after ischemia-reperfusion in rat heart through AT₁ receptor stimulation. *Regul. Pept*. 127, 101–110, 2005.

Pan CH, Wen CH, Lin CS. Interplay of angiotensin II and angiotensin(1-7) in the regulation of matrix metalloproteinases of human cardiocytes. *Exp Physiol*. 93(5):599-612, 2008.

Park CG, Leenen FH. Effects of centrally administered losartan on deoxycorticosterone-salt hypertension rats. *J Korean Med Sci*. 16(5):553-7, 2001.

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

Pinheiro SV, Simões e Silva AC, Sampaio WO, Paula RD, Mendes EP, Bontempo ED. Nonpeptide AVE 0991 is an angiotensin-(1–7) receptor Mas agonist in the mouse kidney. *Hypertension*. 44, 490–496. 2004.

Pörsti I, Bara AT, Busse R, Hecker M. Release of nitric oxide by angiotensin-(1-7) from porcine coronary endothelium: implications for a novel angiotensin receptor. *Br J Pharmacol*. 111(3):652-4, 1994.

Ren Y, Garvin JL, Carretero OA. Vasodilator action of angiotensin-(1-7) on isolated rabbit afferent arterioles. *Hypertension*. 1:39(3):799-802, 2002.

Robert V, Silvestre JS, Charlemagne D, Sabri A, Trouvé P, Wassef M, Swynghedauw B, Delcayre C. Biological determinants of aldosterone-induced cardiac fibrosis in rats. *Hypertension*. 26(6 Pt 1):971-8, 1995

Robert V, Heymes C, Silvestre JS, Sabri A, Swynghedauw B, Delcayre C. Angiotensin AT₁ receptor subtype as a cardiac target of aldosterone: role in aldosterone-salt-induced fibrosis. *Hypertension*. 33(4):981-6, 1999.

Sadoshima J, Izumo S. Molecular characterization of angiotensin II--induced hypertrophy of cardiac myocytes and hyperplasia of cardiac fibroblasts. Critical role of the AT1 receptor subtype. *Circ Res.* 73(3):413-23, 1993.

Sahn DJ, DeMaria A, Kisslo J, Weyman A. Recommendations regarding quantitation in M-mode echocardiography: results of a survey of echocardiographic measurements. *Circulation.* 58:1072-1083, 1978.

Sampaio WO, Nascimento AA & Santos RAS. Systemic and regional hemodynamics effects of angiotensin-(1-7) in rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 284, H1985-H1994, 2003.

Sampaio WO, Santos RAS, Faria-Silva R, Mata Machado LT, Schiffrin EL & Touyz RM. Angiotensin-(1-7) through receptor *Mas* mediates endothelial nitric oxide synthase activation via Akt-dependent pathways. *Hypertension.* 49, 185-192, 2007.

Santos RAS, Brosnihan KB, Chappell MC, Pesquero J, Chernicky CL, Greene LJ. Converting enzyme activity and angiotensin metabolism in the dog brainstem. *Hypertension.* 11, I153-I157, 1988.

Santos RAS, Brum JM, Brosnihan KB, Ferrario CM. The renin angiotensin system during acute myocardial ischemia in dogs. *Hypertension.* 15 (Suppl I): I121-127, 1990.

Santos RAS, Brosnihan KB, Jacobsen WD, Dicorleto PE, Ferrario CM. Production of angiotensin-(1-7) by human vascular endothelium. *Hypertension.* 19 (Suppl II): II56-II61, 1992a.

Santos RAS, Baracho NCV. Angiotensin-(1-7) is a potent anti diuretic in rats. *Braz J Med Biol. Res.* 25: 651-654, 1992b.

Santos RAS, Campagnole-Santos MJ. Central an peripheral actions of angiotensin-(1-7). *Braz J.Med. Bio. Res.* 27: 1033-1047, 1994.

Santos RAS, Campagnole-Santos MJ, Andrade SP. Angiotensin-(1-7): an update. *Regulatory Peptides.* 91:45-62, 2000.

Santos RAS, Simões e Silva AC, Maric C, Silva DM, Machado RP, Buhr I. Angiotensin-(1-7) is an endogenous ligand for the G protein-coupled receptor *Mas*. *Proc Natl Acad Sci USA.* 100, 8258-8263, 2003.

Santos RAS, Ferreira AJ, Nadu AP, Braga ANG, Almeida AP, Campagnole-Santos MJ, Baltatu O, Iliescu R, Reudelhuber TL, Bader M. Expression of an angiotensin-(1-7) producing fusion protein produces cardioprotective effects in rats. *Physiology Genomics*. 17:292-299, 2004.

Santos RAS, Ferreira AJ, Pinheiro SV, SampaioWO, Touyz R, Campagnole-Santos MJ. Angiotensin-(1-7) and its receptor as a potential targets for new cardiovascular drugs. *Expert Opin Investig Drugs*. 14, 1019–1031, 2005.

Santos RAS, Castro HC, Gava E, Pinheiro SVB, Almeida AP, de Paula RD, Cruz JS, Ramos AS, Rosa KT, Irigoyen MC, Bader M, Alenina N, Kitten T, Ferreira AJ. Impairment of In Vitro and In Vivo Heart Function in Angiotensin-(1-7) receptor Mas Knockout Mice. *Hypertension*. 47:1-2, 2006.

Santos RAS, Ferreira AJ. Angiotensin-(1-7) and the renin angiotensin system. *Curr Opin Nephrol Hypertens*. 16:122–128, 2007.

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

Savage DD, Garrison RJ, Kannel WB, *et al*: The spectrum of left ventricular hypertrophy in a general population sample: the Framingham Study. *Circulation*. 75 (Suppl I): I26–I33, 1987.

Schenk J, McNeill JH. The pathogenesis of DOCA-salt hypertension. *J Pharmacol Toxicol Methods*. 27(3):161-70, 1992.

Schiavone MT, Santos RAS, Brosnihan KB, Khosla MC, Chernicky CL, Ferrario CM. Release of vasopressin from the hypothalamo-neurohypophysial system by angiotensin-(1-7) heptapeptide. *Proc Natl. Acad. Sci. USA* 85:4095-4098, 1988.

Schultz Jel J, Witt SA, Glascock BJ, Nieman ML, Reiser PJ, Nix SL, Kimball TR, Doetschman T. TGF-beta1 mediates the hypertrophic cardiomyocyte growth induced by angiotensin II. *J Clin Invest*. 109(6):787-96, 2002.

Shapiro BP, Owan TE, Mohammed S, Kruger M, Linke WA, Burnett JC Jr, Redfield MM. Mineralocorticoid signaling in transition to heart failure with normal ejection fraction. *Hypertension*. 51(2):289-95, 2008.

Silva DM, Vianna HR, Cortes SF, Campagnole-Santos MJ, Santos RA, Lemos VS. Evidence for a new angiotensin-(1-7) receptor subtype in the aorta of Sprague-Dawley rats. *Peptides*. 28(3):702-7, 2006.

Sun Y, Carretero OA, Xu J, Rhaleb NE, Wang F, Lin C, Yang JJ, Pagano PJ, Yang XP. Lack of inducible NO synthase reduces oxidative stress and enhances cardiac response to isoproterenol in mice with deoxycorticosterone acetate-salt hypertension. *Hypertension*. 46(6):1355-61, 2005.

Tallant EA, Ferrario CM, Galaghe PE. Angiotensin-(1-7) inhibits Growth of Cardiac Myocytes Through Activation of the Mas Receptor. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*, 1: 1560-1566, 2005.

Teichholz LE, Cohen MV, Sonnenblick EH, Gorlin R. Study of left ventricular geometry and function by B-scan ultrasonography in patients with and without asynergy. *N Engl J Med*. 5;291(23):1220-6, 1974.

Timmermans PBMWM, Wong PC, Chiu AT, Herbin WF, Benfield P Carini DJ, Lee RJ, Wexler R, Saye J, Smith R. Angiotensin II receptors and Angiotensin II Receptor Antagonists. *Pharmacological Review*, 4: 205-251, 1993.

Tom B, Vries R, Saxena PR, Jan Danser AH. Bradykinin potentiation by angiotensin-(1-7) and ACE inhibitors correlates with ACE C- and N-domain blockade. *Hypertension*. 38:95-99, 2001.

Trippodo NC, Robl JA, Asaad MM, Bird JE, Panchal BC, Schaeffer TR, Fox M, Giancarli MR, Cheung HS. Cardiovascular effects of the novel dual inhibitor of neutral endopeptidase and angiotensin-converting enzyme BMS-182657 in experimental hypertension and heart failure. *J Pharmacol Exp Ther*. 275(2): 745-752, 1995.

Turner AJ, Hooper NM. The Angiotensin-Converting Enzyme Gene family: Genomics and Pharmacology. *Trends In Pharmacological Sciences*, 23(4): 177-183, 2002.

Van Kats JP, de Lannoy LM, Jan Danser AH, van Meegen JR, Verdouw PD, Schalekamp MA. Angiotensin II type 1 (AT1) receptor-mediated accumulation of angiotensin II in tissues and its intracellular half-life in vivo. *Hypertension*. 30 (1 Pt 1): 42-49, 1997

Varagic J, Trask AJ, Jessup JA, Chappell MC, Ferrario CM. New angiotensins. *J Mol Med*. 86:663-671, 2008.

Vickers C, Hales P, Kaushik V. Hydrolysis of biological peptides by human angiotensin-converting enzyme-related carboxypeptidase. *J Biol. Chem* 277 (17): 14838-14843, 2002.

Walther T, Wessel N, Kang N, Sander A, Tschöpe C, Malberg H, Bader M, Voss A. Altered heart rate and blood pressure variability in mice lacking the Mas protooncogene. *Braz J Med Biol Res.* 33(1):1-9, 2000.

Weber KT, Brilla CG. Pathological hypertrophy and cardiac interstitium: fibrosis and renin-angiotensin-aldosterone system. *Circulation.* 83:1849-1865, 1991.

Wei CC, Ferrario CM, Brosnihan KB, Farrell DM, Bradley WE, Jaffa AA, Dell'Italia LJ. Angiotensin peptides modulate bradykinin levels in the interstitium of the dog heart in vivo. *J Pharmacol Exp Ther.* 300(1):324-9, 2002.

Weir MR, Dzau VJ. The Renin-Angiotensin-Aldosterone System: A Specific Target for Hypertension Management. *American Journal of Hypertension.* 12:189S-194S, 1999.

Weyhenmeyer JA, Meyer JM. Angiotensin II in the brain and brainstem of the DOCA salt hypertensive rat. *Clin Exp Hypertens. A.* 7(1):73-92, 1985.

Wright JW, Harding JW. Regulatory role of brain angiotensins in the control of physiological and behavioral responses. *Brain Res Rev.* 17(3):227-62, 1992.

Yamamoto K, Chappel MC, Brosnihan KB, Ferrario CM. In vivo metabolism of angiotensin I by neutral endopeptidase (EC 3.4.24.11) in spontaneously hypertensive rats. *Hypertension.* 19(6 Pt 2):692-6, 1992.

Yamamoto K, Ohishi M, Katsuya T. Deletion of angiotensin-converting enzyme 2 accelerates pressure overload-induced cardiac dysfunction by increasing local angiotensin II. *Hypertension.* 47, 718–726, 2006.

Yin FC, Spurgeon HA, Rakusan K, Weisfeldt ML, Lakatta EG. Mechanical properties of myocardium from hypertrophied rat hearts. *Circ Res.* 46:292-300, 1980.

Yin FC, Spurgeon HA, Rakusan K, Weisfeldt ML, Lakatta EG. Use of tibial length to quantify cardiac hypertrophy: application in the aging rat. *Am J Physiol.* 243(6): H941-947, 1982.

Zisman LS, Meixell GE, Bristow MR & Canver CC. Angiotensin-(1-7) formation in the intact human heart: in vivo dependence on angiotensin II as substrate. *Circulation*. 108, 1679-1681, 2003.

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)