

**AVALIAÇÃO DOS EFEITOS AGUDOS DA ANGIOTENSINA-(1-7) EM CORAÇÕES
ISOLADOS DE RATOS SUBMETIDOS À SOBRECARGA PRESSÓRICA.**

Deny Bruce de Sousa Sobrinho, Gisele Maria Melo Alves, Jônathas. Fernandes Queiroz de Almeida, João Gabriel Dourado, Elizabeth Pereira Mendes, Carlos Henrique de Castro.

Instituto de Ciências Biológicas - Departamento de Ciências Fisiológicas, Universidade Federal de Goiás, Goiânia – GO,

74.001-970, Brasil.

Palavras-chave: Sistema Renina-angiotensina, Angiotensina-(1-7); Hipertrofia cardíaca, Circulação coronariana

Orientando: Deny Bruce de Sousa Sobrinho

E-mail: deny.bruce.s.s@gmail.com

Orientador: Carlos Henrique Castro

E-mail: castroufg@gmail.com

Revisado pelo orientador

Introdução

A hipertrofia ventricular esquerda é uma das respostas à pressão arterial, tendo como consequência um aumento das chances de insuficiência cardíaca, morte súbita, arritmias ventriculares, doença arterial coronária e acidente vascular encefálico. Além disso, a hipertensão acarreta consequências sobre a parede vascular, de forma especial no endotélio, que é mais suscetível aos efeitos lesivos, levando a mudança na taxa de replicação, densidade celular e por consequência na expressão de receptores. (César e Ferreira, 2004)

No processo de hipertrofia cardíaca estão envolvidos mecanismos locais e humorais, como o sistema renina-angiotensina em que a Ang II é a maior responsável por essas alterações, (Ji et al, 2009; Rosenkranz et al, 1997) além do SNA. Essa hipertrofia pode ser considerada como um processo adaptativo do miocárdio a sobrecargas hemodinâmicas crônicas (Franchini, 2001).

O sistema renina-angiotensina (RAS) (Figura 1) é um dos principais moduladores da pressão arterial, sendo composto por uma complexa cascata de enzimas e peptídeos com diversas funções biológicas. Esse sistema desempenha papel primordial na homeostase da pressão arterial e balanço hidroeletrólítico. (Ferreira e Santos, 2005)

A cascata é iniciada pela liberação de aspartil-protease renina nos rins e angiotensinogênio no fígado. A renina é liberada pelas células justaglomerulares do rim em resposta a uma redução da pressão arterial, queda no transporte de sódio no túbulo distal ou aumento do tônus simpático. (Rush e Aultman, 2008). A renina hidrolisa o angiotensinogênio produzindo o decapeptídeo angiotensina I [Ang-(1-10)], que em seguida, por meio da Enzima Conversora de Angiotensina (ECA) abundante no pulmão, células endoteliais, rim e cérebro, produz a angiotensina II [Ang-(1-8)], que ainda podem dar origem a outros peptídeos bioativos menores, como a angiotensina-(1-7) [Ang-(1-7)]. (Rush e Aultman, 2008; Sampaio et al., 2009)

A angiotensina II (Ang II) exerce seus efeitos por meio de dois receptores, receptor de angiotensina tipo 1 (AT₁) e receptor de angiotensina tipo 2 (AT₂). Esses dois receptores exercem efeitos basicamente antagônicos. (Barker et al, 2006; Rush e Aultman, 2008).

As ações da Ang II mediadas por AT₁ incluem vasoconstrição, efeito pró-inflamatórios, mudança no cálcio citosólico, fibrose, efeito cronotrópico e inotrópico positivo, proliferação celular, síntese e secreção de aldosterona e reabsorção tubular de sódio (Sampaio et al., 2009; Zhang e Sun, 2006; Rosenkranz et al, 1997; Rush e Aultman, 2008). Por outro lado, o receptor AT₂ medeia efeito de inibição de proliferação celular, estimula apoptose e

possui um efeito vasodilatador pela formação de bradicinina e óxido nítrico (NO). (Ferreira e Santos, 2005; Rush e Aultman, 2008).

Já a Ang-(1-7), que pode ser formada pela ECA2 (enzima homologa à ECA) diretamente a partir da Ang II ou pela formação de angiotensina-(1-9) com subsequente hidrólise à Ang-(1-7), pela ECA, (Santos et al, 2005) possui efeitos via receptor próprio, que são contra-regulatórios em relação aos efeitos cardiovasculares da Ang II. (Carvalho et al, 2007; Ferreira et al, 2002; He et al, 2010). Esses efeitos incluem vasodilatação, potencialização da vasodilatação por bradicinina, atividade antitrombótica, efeito anti-arritmogênico, melhora a função contrátil pós-isquêmica, inibe proliferação celular e hipertrofia cardíaca, aumenta fluxo renal, facilita baroreflexos, modula a atividade do SNC (Agata et al, 2006; Ferreira e Santos, 2005, Santos et al, 2005). Há alguns anos atrás foi demonstrado por Santos et al. (2003) a existência de um receptor específico para a Angiotensina-(1-7), denominado Mas, que é um receptor acoplado à proteína G.

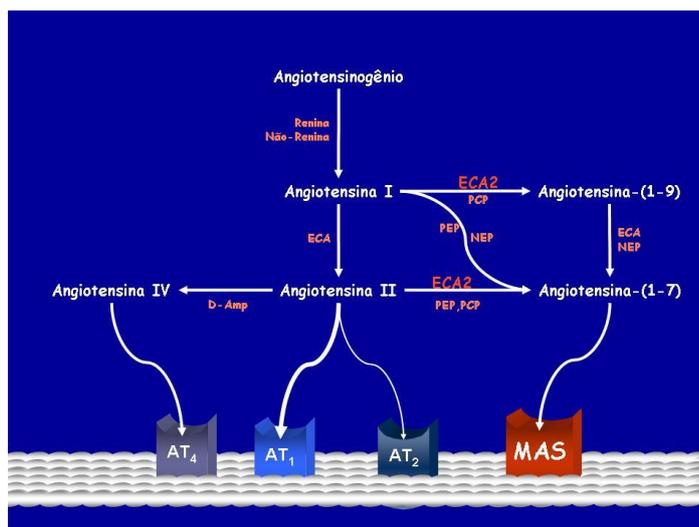


Figura 01. Ilustração do Sistema renina-angiotensina mostrando as vias de formação das angiotensinas e seus receptores. Amp, Aminopeptidases; ECA, Enzima Conversora de Angiotensina; ECA2, Enzima Conversora de Angiotensina 2; NEP, Endopeptidase Neutra; PCP, Prolil-carboxipeptidase; PEP, Prolil-endopeptidase, AT, Receptor de Angiotensina.

Na instalação da hipertrofia cardíaca por sobrecarga pressórica, como no caso de animais submetidos à coarctação de aorta abdominal, há uma alteração da expressão de receptores, de forma especial com um aumento na expressão de AT₁ e AT₂ no ventrículo esquerdo, o que indica um papel crucial da Ang II na instalação do processo de hipertrofia (Akers et al, 2000; Zhu et al, 2003).

A hipertrofia cardíaca também pode ser desencadeada através de estímulos adrenérgicos, independentemente de sobrecarga pressórica. Este mecanismo pode ser claramente observado em modelos animais tratados cronicamente com agonista de receptor β -adrenérgico (Zou et al, 2001).

Os efeitos agudos da Ang-(1-7) em coronárias ratos submetidos à sobrecarga pressórica ainda são desconhecidos. Além disso, a maioria dos estudos avaliou o efeito crônico destes agonistas paralelamente ao desenvolvimento da patologia. Desta forma, a proposta do nosso trabalho será avaliar os efeitos coronarianos da Ang-(1-7) em corações hipertrofiados de ratos

Metodologia

No estudo foram utilizados ratos Wistars machos do biotério central da Universidade Federal de Goiás (UFG), pesando entre 250 e 300 gramas, com acesso livre de água e comida. Esses animais foram divididos em dois grupos básicos, um que sofreu o processo cirúrgico de coarctação e outros animais que não sofreram a coarctação, denominados *sham*.

Coarctação da aorta abdominal:

Para induzir hipertrofia cardíaca por sobrecarga pressórica, os animais foram submetidos à coarctação da aorta abdominal. Para isso, ratos foram anestesiados com Ketamina (70mg/Kg) e xilazina (3mg/Kg). O processo de coarctação resulta em uma diminuição da luz da aorta abdominal superiormente às artérias renais. O procedimento cirúrgico consiste em uma abertura abdominal, aproximadamente a 1,5 cm da coluna vertebral. Uma linha cirúrgica é passada sob a aorta e uma agulha, 23G, é colocada superiormente a ela, realizando em seguida um nó sobre a agulha e o vaso, o que força, após a retirada da agulha, a redução da luz do vaso ao diâmetro da agulha. A parede abdominal é então suturada. Já no grupo falso operado (*sham*), todo o processo cirúrgico foi realizado, com exceção do processo de constrição da aorta abdominal.

Tratamento com isoproterenol

Para induzir hipertrofia cardíaca sem sobrecarga pressórica, os animais receberam tratamento diário de Isoproterenol (2 mg/Kg/dia, s.c.) durante 7 dias. Os animais controles receberam o mesmo volume de veículo (solução salina).

Análise dos modelos de hipertrófica

Para certificar o desenvolvimento da hipertrofia cardíaca, os ventrículos esquerdos (VE) foram dissecados, pesados e o índice de massa ventricular foi calculado pela relação VE/comprimento da tibia.

Coração Isolado

Para analisar a função cardíaca, foi realizada a técnica de coração isolado (Langendorff) por fluxo constante. Após 21 dias do processo cirúrgico os animais foram sacrificados por decapitação, 10 minutos após serem heparinizados (400 UI de heparina) e os corações retirados para uma solução nutritora oxigenada à aproximadamente 4°C. Em seguida os corações foram presos pela aorta ascendente a uma agulha e conectados ao sistema de perfusão com solução nutritora de Krebs-Ringer. O fluxo foi mantido a 10 ml/min a uma temperatura de 37 ± 1 °C.

O coração foi perfundido com solução nutritora oxigenada (5% CO₂ e 95% O₂) de Krebs-Ringer (NaCl 118,41 mmol/L; KCl 4,69 mmol/L; KH₂PO₂ 1,17 mmol/L; MgSO₄.7H₂O 1,17 mmol/L; CaCl₂.2H₂O 2,51 mmol/L; Dextrose anidra (glicose) 11,65 mmol/L; NaHCO₃ 26,24 mmol/L).

No ápice do coração foi conectado um transdutor de força para registro de tensão sistólica e diastólica, sendo aplicada uma tensão diastólica inicial de 1g. Um transdutor de pressão foi acoplado no sistema de nutrição por uma abertura lateral logo acima da conexão do coração. Os dados foram registrados por um sistema Dataq. A frequência cardíaca e as derivadas da tensão (+dT/dt e -dT/dt) foram calculadas

Para análise da resposta cardíaca à angiotensina-(1-7) (20 pmol/L), após um período inicial de estabilização (30 minutos), a Ang-(1-7) foi adicionada à solução nutritora, na presença ou ausência de A-779 (2 nmol/L) e os corações foram perfundidos por um período adicional de 15 minutos.

Análise estatística

Todos os dados foram expressos através da média dos valores \pm erro padrão médio. A Significância estatística dos dados de pressão de perfusão absoluta foi feita através do teste t-

student. Para os dados de variação da pressão de perfusão a análise estatística foi calculada através do one-way ANOVA (GraphPad Prism 4.0).

Resultados

O modelo de coarctação de aorta produziu uma mudança cardíaca considerada, com aumento do peso total do coração e com hipertrofia ventricular esquerda. (tabela 1).

Tabela 1 – Peso corporal, peso do coração, ventrículo esquerdo e índice de massa ventricular dos animais coarctados e *Sham*.

	<i>Sham</i>	Coarctado
Peso corporal (g)	276,4 ± 6,660	260,2 ± 10,50
Peso coração (g)	0,882 ± 0,027	1,033 ± 0,059*
Ventrículo esquerdo (g)	0,661 ± 0,019	0,730 ± 0,046*
Índice de massa ventricular (g/cm)	0,174 ± 0,004	0,217 ± 0,012**

Os valores representam a média ± erro padrão da média. Teste t de student .*p< 0,05 vs Sham; **p<0,0001 vs Sham.

Os parâmetros basais dos corações isolados (antes da adição da Ang-(1-7)), estão representados na Tabela 2.

Tabela 2 - Parâmetros basais dos corações isolados de animais coarctados e *Sham*.

	<i>Sham</i>	Coarctado
Pressão de Perfusão	103,5 ± 7,14	77,26 ± 7,49 *
Tensão Sistólica	8,37 ± 1,12	4,65 ± 0,83 *
+dt/DT	134,80 ± 19,60	64,64 ± 15,35 *
-dt/DT	137,00 ± 21,14	64,64 ± 15,35*
Frequência cardíaca	260,90 ± 5,23	261,10 ± 6,50

Os valores representam a média ± erro padrão da média. Teste t de student .*p< 0,05 vs Sham.

Os corações dos animais controle (*sham*) tiveram uma resposta à infusão de Ang-(1-7) (20 pmol/L) com significativa vasodilatação, como observado pela redução da pressão de

perfusão (PP). Esse efeito vasodilatador da Ang-(1-7) foi completamente abolido na presença do antagonista do receptor Mas, A-779. (Figura 3)

Já nos animais coarctados, a sobrecarga pressórica e consequente hipertrofia cardíaca, levou a abolição da resposta à infusão de Ang-(1-7) (Figura 2).

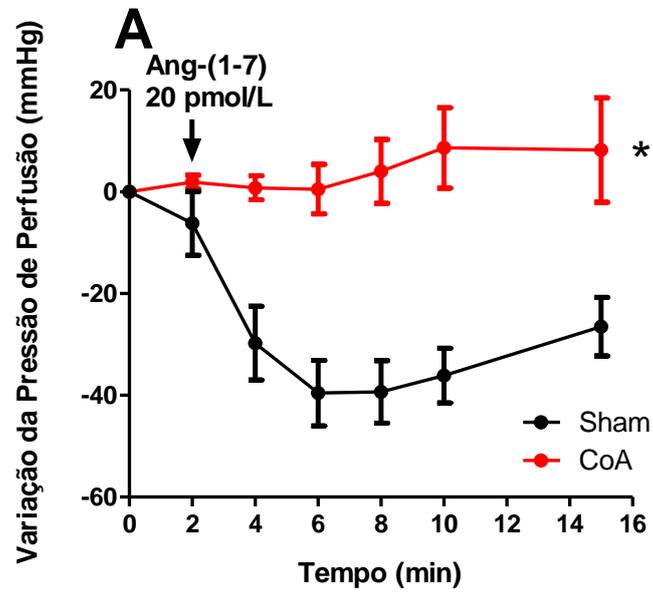


Figura 2. Efeito da Ang-(1-7) (20pmol/L) na variação da pressão de perfusão em animais coarctados (CoA) e Sham. Two-way ANOVA, *p <0,01.

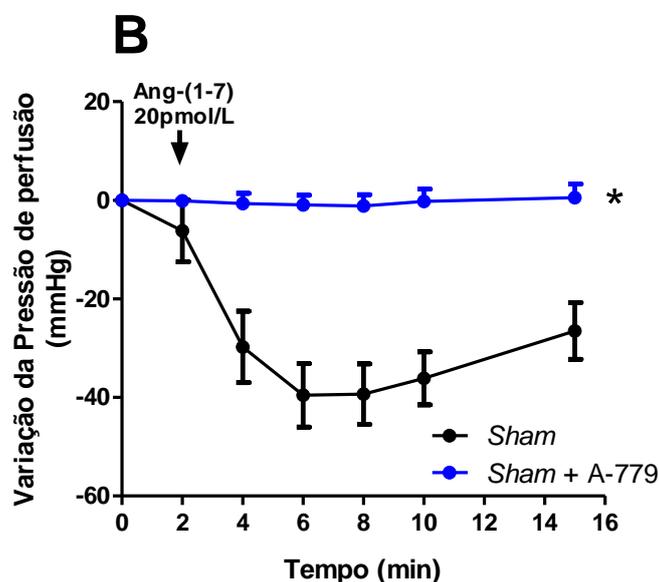


Figura 3. Efeito da Ang-(1-7) (20pmol/L) na variação da pressão de perfusão em animais *Sham* na presença ou ausência de A-779. Two-way ANOVA, * $p < 0,01$.

O tratamento com isoproterenol (2 mg/Kg/dia) também levou a alterações nas características do coração, com desenvolvimento de uma elevada hipertrofia cardíaca. (Tabela 3)

Tabela 3 – peso corporal, coração, ventrículo e índice de massa ventricular dos animais tratados com isoproterenol e veículos.

	<i>Veículo</i>	Isoproterenol
Peso corporal (g)	294,20 ± 7,21	233,50 ± 7,91 ***
Peso coração (g)	0,900 ± 0,024	1,158 ± 0,036 ***
Ventrículo esquerdo (g)	0,627 ± 0,016	0,816 ± 0,033 ***
Índice de massa ventricular (g/cm)	0,173 ± 0,005	0,245 ± 0,009 ***

Os valores representam a média ± erro padrão da média. Teste t de student *** $p < 0,001$ vs veiculo

Diferentemente dos corações hipertrofiados por sobrecarga pressórica, os corações dos animais tratados com isoproterenol apresentaram significativa resposta vasodilatadora

induzida pela Ang-(1-7). No entanto, esta resposta foi atenuada em relação ao seu controle. (Figura 4).

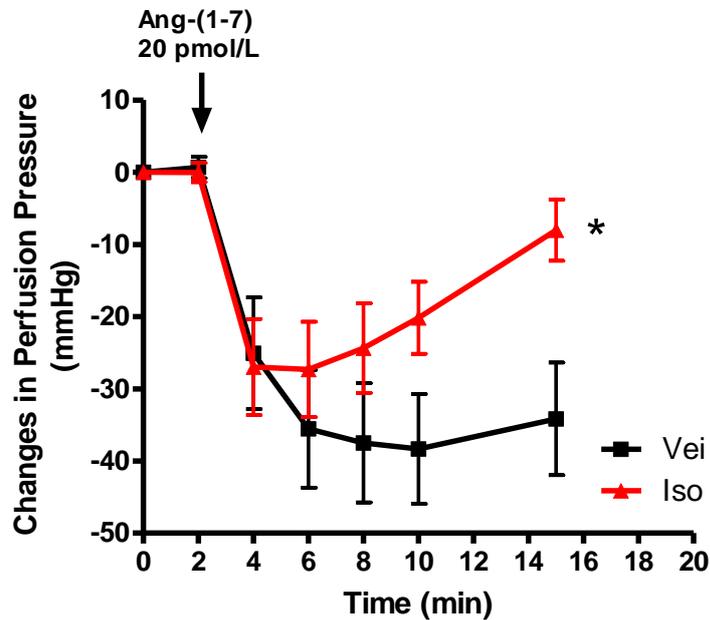


Figura 03. Efeito da Ang-(1-7) (20 pmol/L) na variação da pressão de perfusão em corações de ratos tratados com isoproterenol (Iso) (2mg/Kg/dia) e veiculo (Vei). Two-way ANOVA, * $p < 0,01$.

Discussão

A sobrecarga pressórica induzida pela hipertensão, assim como por coarctação da aorta abdominal causa alterações estruturais e funcionais no coração, como desenvolvimento de hipertrofia cardíaca e deposição de colágeno, o que pode alterar a resposta às drogas e substâncias endógenas (Tang e Vanhoutte, 2010).

A resposta vasodilatadora da Ang-(1-7) deve-se à ligação ao receptor Mas. (Sampaio e Santos, 2009). Além disso, estudos têm indicado uma interação entre os diversos receptores (Mas, AT₁ e AT₂) do sistema para a produção do efeito final. (He et al, 2010). Estudos em camundongos geneticamente modificados, que não expressão o receptor Mas demonstra alterações cardiovasculares com comprometimento da função cardíaca e modificações estruturais, disfunção endotelial e hipertensão. (Sampaio et al, 2009)

Neste estudo, observamos importante resposta vasodilatadora da Ang-(1-7) em animais controles. Estes resultados corroboram com estudos prévios que indicam o efeito hipotensor

da Ang-(1-7) via Mas, resposta oposta às ações da Ang II via AT₁R. Entretanto, a Ang-(1-7) não apresentou efeito vasodilatador nos corações hipertrofiados por sobrecarga pressórica. O aumento dos níveis de Ang II, acompanhado do aumento da expressão de receptores AT₁R em animais com hipertrofia cardíaca (Akers et al, 2000; Zhu et al, 2003), podem ser uma possível causa da abolição da resposta a Ang-(1-7), indicando um comprometimento da regulação do sistema renina-angiotensina nesses animais. Outro possível fator envolvido na perda da resposta vasodilatadora da Ang-(1-7) é a disfunção endotelial. Diversos trabalhos mostram que a sobrecarga pressórica induzida por coarctação da aorta causa severa disfunção endotelial sistêmica (REF) e os efeitos vasodilatadores da Ang-(1-7) são dependentes do endotélio (Sampaio et al, 2007).

Diferentemente dos corações submetidos à sobrecarga pressórica, os corações dos animais tratados com isoproterenol apresentaram significativa resposta vasodilatadora da Ang-(1-7). Isso reforça a hipótese do comprometimento do endotélio gerado pela sobrecarga pressórica como responsável pela perda de efeito vasodilatador, e não exatamente a instalação da hipertrofia cardíaca.

Conclusões

Nossos dados mostram que a sobrecarga pressórica induzida pela coarctação da aorta abdominal promove importantes alterações na circulação coronariana, com possível disfunção endotelial, responsáveis pela perda dos efeitos vasodilatadores da Ang-(1-7).

Agradecimentos

Agradecemos ao apoio financeiro do CNPq e INCT-NanoBiofar.

Referências

Agata J., Ura N., Yoshida H., Shinshi Y., Sasaki H., Kyarkkoku M., Taniguchi S., Shimamoto K.(2006). Olmesartan I na Angiotensin II Receptor Blocker with na Inhibitory Effect on Angiotensin-Converting Enzyme. *Hypertenses Res* Vol. 29, No. 11

Akers, W. S., Cross, A., Speth, R., Dwoskin, L. P., and Cassis, L. A. (2000). Renin-angiotensin system and sympathetic nervous system in cardiac pressure-overload hypertrophy. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **279**, H2797-2806.

Barker T. A., Massett M. P., Korshunov V. A., Mohan A. M., Kennedy A. J., and Berk B. C. (2006). Angiotensin II Type 2 Receptor Expression After Vascular Injury: Differing

Carvalho M. B. L, Duarte F. V., Silva R. F., Fauler B., Machado L. T. M., Paula R. P., Santos M. J. C., Santos R. A. S. (2007). Evidence for Mas-Mediated Bradykinin Potentiation by the Angiotensin-(1-7) Nonpeptide Mimic AVE 0991 in Normotensive Rats. *Hypertension* 2007; **50**; 762-767.

César L. A. M., Ferreira J. F. M. (2004). Circulação coronariana: aspectos fisiológicos. *Hipertensão* (2004) vol **7** nº1.

Effects of Angiotensin-Converting Enzyme Inhibition and Angiotensin Receptor Blockade. *Hypertension* 2006; **48**; 942-949.

Ferreira A. J., and Santos R. A. S.,(2005). Cardiovascular actions of Angiotensin-(1-7). (2005). *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* (2005) **38**: 499-507.

Ferreira A. J., Santos R. A. S., and Almeida A. P.(2002). Angiotensin-(1-7) improves the post-ischemic function in isolated perfused rat hearts. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* (2002) **35**: 1083-1090.

Franchini, K. G. (2001). Hipertrofia cardíaca: mecanismos moleculares. *Rev Bras Hipertens* 8, 125-142.

He J.G., Chen S. L., Huang Y. Y., Chen Y. L., Dong Y. G., Ma H. (2010). The nonpeptide AVE0991 attenuates myocardial hypertrophy as induced by angiotensin II trough dowregulation of transforming growth factor- β 1/Smad2 expression. *Heart Vessels* (2010) **25**: 438-443.

James W.E. R., and Aultman C. D. (2008). Vascular biology of angiotensin and the impact of physical activity. *Appl. Physiol. Nutr. Metab.* **33**: 162-172 (2008),.

Ji K., Minakawa M., Fukui K., Suzuki Y., Fukuda I. (2009). Olmesartan improves left ventricular function in pressure-overload hypertrophied rat heart by blocking angiotensin II

receptor with synergic effects of upregulation of angiotensin converting enzyme 2. *Therapeutic Advances in Cardiovascular Disease* (2009) **3(2)** 103-111.

Rosenkranz S., Nickenin G., Flesch M., Cremers B., Schnabel P., Lenz O., Krause T., Ganten D., Hoffmann S., Böhm M.(1997). Cardiac angiotensin II receptors: studies on functional coupling in Sprague-Dawley rats and TGR(α MHC-hAT₁) transgenic rats. *European Journal of Pharmacology* **330** (1997) 35-46.

Sampaio W. O., Pinheiro S. V., Santos R. A. S. (2009). Aspectos fisiológicos e fisiopatológicos do sistema renina-angiotensina: ênfase na função vascular. *Hipertensão* 2009; **12(2)**: 40-50.

Sampaio W. O., Santos R. A. S., Silva R. F., Machado L. T. M., Schiffrin E. L., Touyz R. M.,(2007). Angiotensin-(1-7) Through Receptor Mas Mediates Endothelial Nitric Oxide Synthase Activation via Akt-Dependent Pathways. *Hypertension* 2007; **49**; 185-192.

Santos R.A.S., Silva A. C. S., Maric C., Silva D. M. R., Machado R. P., Buhr I., Walther S. H., Pinheiro S. V. B., Lopes M. T., Bader M., Mendes E. P., Lemos V. S., Santos M. J. C., Schultheiss H. P., Speth R., e Walther T., (2003). Angiotensin-(107) is na endogenous ligand for the G protein-coupled receptor Mas. *PNAS* Vol. **100**, nº 14 8258 – 8263.

Santos R.A.S., Ferreira A. J., Pinheiro S. V.B., Sampaio W. O., Touyz R., Santos M. J. C.(2005). Angiotensin-(1-7) and its receptor as a potential targets for new cardiovascular drugs. *Expert. Opin. Investig. Drugs* (2005) **14**(8).

Tang E. H. C., Vanhoutte P. M., (2010). Endothelial dysfunction: a strategic target in the treatment of hypertension?. *Pflugers Arch – Eur J Physiol* (2010) **459**: 995-1004.

Zhang H., Sun G.Y., (2006). Expression and Regulation of AT₁ Receptor in Rat Lung Microvascular Endothelial Cell. *Journal of Surgical Research* **134**, 190-197(2006)

Zhu Y.C., Zhu Y.Z., Lu N., Wang M. J., Wang Y.X., Y T.(2003). Role of angiotensin AT₁ and AT₂ receptors in cardiac hypertrophy and cardiac remodelling. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology* (2003) **30**, 911-918.

Zou Y., Yao A., Zhu W., Kudoh S., Hiroi Y., Shimoyama M., Uozumi H., Kohmoto O., Takahashi T., Shibasaki F., Nagai R., Yazaki Y., e Komuro I., (2001). Isoproterenol Activates Extracellular Signal-Regulated Protein Kinases in Cardiomyocytes Through Calcineurin. *Circulation* 2001; **104**; 102-108