Universidade de São Paulo
Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto
Departamento de Fisiologia

Thaís Caroline Prates Costa

Papel da Enzima conversora de Angiotensina (ECA) e da Elastase-2, vias formadoras de Angiotensina II, no controle hemodinâmico e autonômico no envelhecimento em camundongos

Ribeirão Preto
2018

Thaís Caroline Prates Costa

Papel da Enzima conversora de Angiotensina (ECA) e da Elastase-2, vias formadoras de Angiotensina II, no controle hemodinâmico e autonômico no envelhecimento em camundongos

Dissertação de Mestrado apresentada ao Departamento de Fisiologia, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, para aquisição do título de Mestre em Ciências.

Área de concentração: Fisiologia

Orientador: Prof. Dr. Helio Cesar Salgado

Ribeirão Preto
2018

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Ficha Catalográfica

Prates Costa, Thaís Caroline

Papel da Enzima conversora de Angiotensina (ECA) e da Elastase-2, vias formadoras de Angiotensina II, no controle hemodinâmico e autonômico no envelhecimento em camundongos. Ribeirão Preto – São Paulo, 2018.

66 f. 30 cm

Dissertação (Mestrado em Ciências – Área de concentração: Fisiologia) – Programa de Pós-Graduação em Fisiologia, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo.

Orientador: Prof. Dr. Salgado, Helio Cesar.

ELA-2, 2. camundongos, 3. envelhecimento, 4. Angiotensina II.

FOLHA DE APROVAÇÃO

COSTA, Thaís Caroline Prates. Papel da Enzima conversora de Angiotensina (ECA) e da Elastase-2, vias formadoras de Angiotensina II, no controle hemodinâmico e autonômico no envelhecimento em camundongos. 2018. 66 f. Dissertação (Mestrado em Ciências – Fisiologia) – Programa de Pós-Graduação em Fisiologia – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo. Ribeirão Preto, 2018.

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr. Helio Cesar Salgado (Orientador e Presidente da Banca)

Instituição: FMRP – RP

Assinatura: _____

Prof. Dr.

Instituição:

Assinatura: _____

Prof. Dr.

Instituição:

Assinatura: _____

Prof. Dr.

Instituição:

Assinatura: _____

DEDICATÓRIA

“Por pior que a vida pareça, sempre existe algo que você pode fazer e ser bem sucedido. Enquanto há vida, há esperança”.

Stephen Hawking.

Dedico esse trabalho à memória de Gabrielle Almeida Alves.

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer primeiramente a Deus, pela força, pela fé e pela vida.

Agradeço aos meus pais, Sérgio e Vera, a minha irmã Thaiane, e a toda minha família, pelo suporte incondicional em todos os aspectos da minha existência. Obrigada por todo o amor, pela paciência e por me ensinarem persistência, honestidade e bondade.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Helio Cesar Salgado, obrigada pela oportunidade, por acreditar na minha competência e ter me ofertado um ambiente onde eu pudesse crescer tanto profissionalmente, quanto pessoalmente.

A Dra. Christiane Becari, que com grande entusiasmo auxiliou a estruturação e finalização desse estudo.

Ao Prof. Dr. Rubens Fazan Jr, pelos conselhos e auxílio ao longo do curso.

Ao técnico de laboratório Mauro de Oliveira, pelo companheirismo, paciência e principalmente pela amizade. Por todo o suporte e engajamento, que permitiram em grande parte, a execução desse trabalho.

Aos técnicos de laboratório Jaci A. Castania e Carlos Alberto Aguiar, pela amizade, orientações e a divertida convivência diária.

Aos pós-graduandos, Dr. Luiz Eduardo Virgilio da Silva, Dra. Aline Ribeiro e o recém chegado Dr. Nilton Nascimento dos Santos Jr, pelo incentivo e disposição sempre que precisei de auxílio.

Em especial as minhas amigas, companheiras de departamento e de vida, Karolyne Magalhães, Aline Zanatta e Amanda Lima, pela convivência diária, os “banhos de sol”, pelos almoços de domingo, as muitas risadas, os cafés, o carinho, a cumplicidade e irmandade.

Aos meus amigos, companheiros de departamento e laboratório, Darlan Basílio, Sabrina Tristão, Amanda Rosanna, Fernanda Brognara, Ana Carolina Omoto e Thaís Marques. Cada um contribui de maneiras extraordinárias para meu crescimento. Obrigada primeiramente pela linda amizade, pelos momentos de descontração, pelos conselhos pessoais e profissionais, pelo suporte e pelo incentivo.

A todos os colegas pós-graduandos e alunos de iniciação científica que não foram citados, mas fizeram desse período, um dos mais enriquecedores e que serão pra sempre lembrados com muito carinho.

Aos amigos Luís Felipe Ribeiro Romano, Andrews Araújo de Almeida e Alex Robert Paterson, que mesmo de longe mantiveram a cumplicidade, sempre me incentivando, com muito carinho e dedicação para prosseguir.

A todos os funcionários do departamento. Em especial, muito obrigada, Cláudia e Elisa, por toda atenção, orientações e carinho desde até mesmo, antes do meu ingresso no programa.

À Universidade de São Paulo (USP).

À Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (FMRP).

Ao Departamento de Fisiologia (FMRP-USP).

E finalmente a todos que contribuíram direta ou indiretamente para a conclusão dessa etapa da minha jornada.

Esse trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Fisiologia Cardiovascular pela Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (FMRP) da Universidade de São Paulo (USP). Com apoio financeiro das seguintes agências de fomento:

Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP;
Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq;
Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES;
Fundação de Apoio ao Ensino, Pesquisa e Assistência – FAEPA.

RESUMO

COSTA, Thaís Caroline Prates. Papel da Enzima conversora de Angiotensina (ECA) e da Elastase-2, vias formadoras de Angiotensina II, no controle hemodinâmico e autonômico no envelhecimento em camundongos. 2018. 66 f. Dissertação (Mestrado em Ciências – Fisiologia) – Programa de Pós-Graduação em Fisiologia – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo. Ribeirão Preto, 2018.

O sistema renina angiotensina (SRA) é descrito como uma complexa cascata hormonal que participa de inúmeros processos fisiológicos. Além da enzima conversora de angiotensina (ECA), outras vias independentes da ECA têm sido descritas como geradoras alternativas de angiotensina II (ANG II), por exemplo, a elastase-2 (ELA-2). A deleção do gene que expressa a ELA-2 é capaz de influenciar o balanço simpátovagal. Sabe-se que existe estreita relação entre a atividade do SRA e a expectativa de vida. Tendo em vista a participação da ELA-2 no perfil autonômico e hemodinâmico de camundongos, e as alterações do sistema cardiovascular na senescência, seria interessante a avaliação do perfil cardiovascular de camundongos idosos nocautes para ELA-2 (ELA-2 KO). O aumento da atividade parassimpática, característica dos camundongos ELA-2 KO, poderia ser um fator protetivo em relação às alterações deletérias características do envelhecimento. O objetivo do presente estudo foi investigar o papel da ELA-2, com relação ao fenótipo cardiovascular e autonômico, no envelhecimento, e avaliar a participação da ECA, também no envelhecimento, nos camundongos ELA-2 KO. Foram estudados camundongos ELA-2 KO machos, jovens (3-4 meses) tratados com salina, e idosos (10-12 meses), tratados com salina ou enalapril. O tratamento teve duração de 10 dias, e foi realizado por meio de gavagem. No quinto dia de tratamento, os camundongos foram submetidos à cirurgia para canulação da artéria femoral e veia jugular. A seguir, cinco dias após a cirurgia procedeu-se o registro hemodinâmico dos animais acordados. A variabilidade da pressão arterial sistólica (PAS) e intervalo de pulso (IP) foi avaliada no domínio do tempo, e da frequência, enquanto a sensibilidade do barorreflexo espontâneo foi avaliada por meio do método de sequência. Não foram observadas diferenças no fenótipo hemodinâmico e autonômico de camundongos ELA-2 KO jovens e idosos; exceto a redução da eficácia barorreflexa no grupo idoso. O tratamento com enalapril reduziu a pressão arterial média (PAM), e promoveu taquicardia, em camundongos ELA-2 KO idosos, quando comparados com os tratados com salina. Entre os grupos idosos não foram observadas diferenças entre os parâmetros referentes à variabilidade da FC. O tratamento com enalapril não promoveu alterações nos índices de sensibilidade barorreflexa. Portanto, sugere-se que a ELA-2 possa contribuir para os efeitos deletérios relacionados à atividade do SRA no envelhecimento. Embora a inibição da ECA tenha alterado os parâmetros hemodinâmicos avaliados entre os camundongos idosos, a mesma não alterou, significativamente, a variabilidade da FC e da PAS.

Palavras chave: *Elastase-2*; camundongos; envelhecimento; Angiotensina II.

ABSTRACT

COSTA, Thaís Caroline Prates. Role of angiotensin converting enzyme (ACE) and elastase-2, alternative pathways for yielding angiotensin II, in the hemodynamic and autonomic control during aging in mice. 2018. 66 f. Dissertação (Mestrado em Ciências – Fisiologia) – Programa de Pós-Graduação em Fisiologia – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo. Ribeirão Preto, 2018.

The renin angiotensin system (RAS) is described as a complex hormonal cascade that participates in numerous physiological processes. In addition to the angiotensin converting enzyme (ACE), other ACE-independent pathways have been described as alternative generators of angiotensin II (ANG II), such as elastase-2 (ELA-2). The deletion of the ELA-2 is able to influence the sympathovagal balance. Furthermore, a close relationship between RAS activity and life span has been established. Considering the participation of ELA-2, in the autonomic and hemodynamic profile of mice, and changes in the cardiovascular system in senescence, it would be pertinent to evaluate the cardiovascular profile of elderly knockout mice for ELA-2 (ELA-2 KO). The increase in parasympathetic activity, characteristic of ELA-2 KO, could be a protective factor in relation to deleterious changes characteristic of aging. The aim of the present study was to investigate the role of ELA-2 in the cardiovascular and autonomic phenotype in aging, and to evaluate the participation of ACE in the aging of ELA-2 KO mice. Male ELA-2 KO mice, young (3-4 months, treated with saline) and elderly (10-12 months, treated with saline or enalapril) were studied. The treatment lasted 10 days and was performed by gavage. On the fifth day of treatment, the mice underwent surgery for cannulation of the femoral artery and jugular. Subsequently, five days after surgery hemodynamic recording of the awake animals was performed. The variability of systolic blood pressure (SBP) and pulse interval (PI) was evaluated in the time and frequency domain and the sensitivity of the spontaneous baroreflex, evaluated by the sequencing method. No differences were observed in the hemodynamic and autonomic phenotype of young and elderly ELA-2 KO mice, except for the reduction of baroreflex effectiveness in the elderly group. Treatment with enalapril reduced mean arterial pressure (MAP) and promoted tachycardia in elderly ELA-2 KO mice when compared to saline treated. Among the elderly groups, no differences were observed between the parameters referring to HR variability. Treatment with enalapril did not promote changes in baroreflex sensitivity indexes. Therefore, it is suggested that ELA-2 may contribute to the deleterious effects related to RAS activity in aging, since elderly ELA-2 KO mice have hemodynamic and autonomic phenotypes similar to that of young mice. Although the inhibition of ACE altered the hemodynamic parameters evaluated among the elderly mice, it did not alter the HR and SBP variability.

Key words: *Elastase-2*; mice; aging; Angiotensin II.

LISTA DAS FIGURAS

Imagem 1: Representação esquemática dos peptídeos e enzimas participantes do SRA. Enzima conversora de angiotensina (ECA). Enzima conversora de angiotensina 2 (ECA2). Aminopeptidase A (APA). Aminopeptidase N (APN). As setas centrais representam o eixo principal do SRA: Angiotensinogênio, Renina, ANG I, ECA, ANG II, receptores AT₁ e AT₂. As setas pontilhadas representam outros ramos do eixo central, ou seja, geração de angiotensinas, que não ANG II, por outras enzimas, que não a ECA (ECA2, APA, APN). As setas escuras apontam para os respectivos receptores 18

Diagrama 1: Protocolo experimental para o tratamento crônico, com enalapril ou salina, por gavagem 26

Imagem 2: Gel de agarose 3% corado com Sybr Safe (5 µL/100 mL de agarose) para identificação da presença das bandas referentes aos genes modificado (-) e selvagem (+) em camundongos. (MW) marcador de peso molecular de 100 pb. Animal nocaute (KO) (-/-) e animal heterozigoto (+/-) 28

Diagrama 2: Protocolo experimental do registro hemodinâmico da pressão arterial 30

Imagem 3: Imagem do registro hemodinâmico de um camundongo ELA-2 KO controle, após o tratamento crônico com salina 0,9% (0,1 mL, durante 10 dias) 30

Imagem 4: Imagem do registro hemodinâmico de um camundongo ELA-2 KO após tratamento crônico com enalapril (15 mg/kg/dia, durante 10 dias) 31

Imagem 5: Representação de exemplos de padrões 0V, 1V, 2LV e 2UV. Imagem adaptada de Porta e cols., 2007 33

Figura 1: Peso corporal (g) de camundongos ELA-2 KO jovens, idosos, e idosos tratados cronicamente com enalapril por 10 dias. Comparações realizadas por meio do teste **ANOVA** de uma via. Dados apresentados como média $\pm$ EPM. * $p > 0,05$

..... 36

Figura 2: Pressão Arterial Média (mmHg), de camundongos elastase-2 jovens (n=4) e idosos (n=6). Dados apresentados como média $\pm$ EPM. Comparação realizada por meio do teste *t* 37

Figura 3: Pressão Arterial Média (mmHg) de camundongos ELA-2 KO após 10 dias de tratamento por gavagem com salina (n=6) e enalapril (n=7). Dados apresentados como média $\pm$ EPM. Comparação realizada por meio do teste *t* 38

Figura 4: Efeito do tratamento com enalapril sobre a resposta pressórica à administração de ANG I e ANG II. (a) variação (Δ) da pressão arterial média (PAM) após administração de ANG I; (b) Δ de PAM após a administração de ANG II, em camundongos elastase 2-KO idosos, cronicamente tratados com salina (n = 6), ou enalapril (n = 7). Dados apresentados como média $\pm$ EPM. Comparação realizada por meio do teste *t*. * $p < 0,05$ 39

Figura 5: Frequência cardíaca basal de camundongos elastase 2-KO jovens (n=4) e idosos (n=6). Dados apresentados como média $\pm$ EPM. Comparação realizada por meio do teste *t* 40

Figura 6: Frequência cardíaca basal de camundongos ELA-2 KO após o tratamento crônico com enalapril (n=7) ou salina (n=6). Dados apresentados como média $\pm$ EPM. Comparação realizada por meio do teste *t*. * $p > 0,05$ 40

Figura 7: Pressão arterial sistólica (PAS; painel a) de camundongos ELA-2 KO e potência da banda de baixa frequência (LF; **painel b**) do espectro da pressão arterial sistólica de camundongos elastase 2-KO jovens (n=4) e idosos (n=6). **LF:** Baixa frequência. Dados apresentados como média $\pm$ EPM. Comparação realizada por meio do teste *t* 43

Figura 8: Pressão arterial sistólica (**PAS**; **painel a**) de camundongos ELA 2-KO idosos e Potência da banda de baixa frequência (**LF**; **painel b**) do espectro da pressão arterial sistólica no domínio da frequência de camundongos elastase 2-KO tratados com salina (controle, n=6) ou enalapril (n=7). **LF**: Baixa frequência. Dados apresentados como média $\pm$ EPM. Comparação realizada por meio do teste t * $p < 0,05$ 44

Figura 9: Variabilidade do intervalo de pulso, no domínio da frequência, de camundongos elastase 2-KO jovens e idosos. Painel a: Potência da banda de **HF** em unidades normalizadas (nu); **Painel b:** potência da banda de **LF** em unidades normalizadas (nu); **Painel c:** Razão entre as potências das bandas de **LF** e **HF**. Camundongos ELA-2 KO jovens (n=4) e idosos (n=6). **HF**: alta frequência; **LF**: baixa frequência. Dados apresentados como média $\pm$ EPM, * $p < 0,05$, teste t 45

Figura 10: Variabilidade do intervalo de pulso, no domínio da frequência, de camundongos ELA-2 KO jovens e idosos tratados com salina ou enalapril.
Painel a: (a) Potência da banda de **HF** em unidades normalizadas (nu); **Painel b:** potência da banda de **LF** em unidades normalizadas (nu); **Painel c:** Razão entre as potências da banda de **LF** e **HF** do espectro do intervalo de pulso (**IP**). Camundongos ELA-2 KO tratados com enalapril (n=6) ou salina (n=7). **HF**: banda de alta frequências; **LF**: banda de baixa frequência. Dados apresentados como média $\pm$ EPM. Comparação realizada por meio do teste t 46

Figura 11: Análise simbólica do espectro da pressão arterial sistólica (PAS) de camundongos ELA-2 KO jovens (n=4) e idosos (n=6). Painel a: 0V: três símbolos iguais indicando modulação simpática; **Painel b: 1V:** uma variação, dois símbolos iguais e um diferente, indicando tanto modulação simpática quanto parassimpática; **Painel c: 2LV:** duas variações semelhantes, indicando modulação parassimpática; **Painel d: 2UV:** duas variações diferentes indicando modulação parassimpática. Dados apresentados como média $\pm$ EPM. Comparação realizada por meio do teste t 47

Figura 12: Análise simbólica do espectro do intervalo de pulso (IP) de camundongos ELA-2 KO jovens (n=4) e idosos (n=6). **Painel a: 0V:** três símbolos iguais indicando modulação simpática; **Painel b: 1V:** uma variação, dois símbolos iguais e um diferente, indicando tanto modulação simpática quanto parassimpática; **Painel c: 2LV:** duas variações semelhantes, indicando modulação parassimpática; **Painel d: 2UV:** duas variações diferentes indicando modulação parassimpática. Dados apresentados como média $\pm$ EPM. Comparação realizada por meio do teste t. *p < 0,05 48

Figura 13: Análise simbólica do espectro da pressão arterial sistólica (PAS) de camundongos ELA-2 KO após o tratamento crônico com enalapril (n=7) ou salina (n=6). **Painel a: 0V:** três símbolos iguais indicando modulação simpática; **Painel b: 1V:** uma variação, dois símbolos iguais e um diferente, indicando tanto modulação simpática quanto parassimpática; **Painel c: 2LV:** duas variações semelhantes, indicando modulação parassimpática; **Painel d: 2UV:** duas variações diferentes indicando modulação parassimpática. Dados apresentados como média $\pm$ EPM. Comparação realizada por meio do teste t. *p < 0,05 49

Figura 14: Análise simbólica do espectro do intervalo de pulso (IP) de camundongos ELA-2 KO após tratamento crônico com enalapril ou salina. **Painel a: 0V:** três símbolos iguais indicando modulação simpática; **Painel b: 1V:** uma variação, dois símbolos iguais e um diferente, indicando tanto modulação simpática quanto parassimpática; **Painel c: 2LV:** duas variações semelhantes, indicando modulação parassimpática; **Painel d: 2UV:** duas variações diferentes indicando modulação parassimpática. Dados apresentados como média $\pm$ EPM. Comparação realizada por meio do teste t 50

Figura 15: Índices de sensibilidade do barorreflexo espontâneo de camundongos ELA-2 KO. **Painel a:** Ganho do barorreflexo espontâneo (ms/mmHg); **Painel b:** Índice da efetividade barorreflexa (BEI) de camundongos ELA-2 KO jovens (n=4) e idosos (n=6). Dados apresentados como média $\pm$ EPM. Comparação realizada por meio do teste t. *p < 0,05 51

Figura 16: Índices de sensibilidade do barorreflexo espontâneo de camundongos ELA-2 KO idosos após o tratamento com enalapril. Painel a: Ganho do barorreflexo espontâneo (ms/mmHg); **Painel b:** Índice da efetividade barorreflexa (**BEI**) de camundongos ELA-2 KO tratados cronicamente com enalapril (n=7) e salina (n=6) 51

LISTA DAS TABELAS

Tabela 1: Pressão arterial média (PAM) basal; variação (Δ) da PAM em resposta à administração de ANG I; e em resposta à administração de ANG II. Dados apresentados como média $\pm$ EPM. Comparação realizada por meio do teste t 38

Tabela 2: Frequência cardíaca de camundongos ELA-2 KO. FC basal. Dados apresentados como média $\pm$ EPM. Comparação realizada por meio do teste t.* $p < 0,05$: camundongos idosos ELA-2 KO tratados com enalapril versus tratados com salina 41

Tabela 3: Variabilidade da pressão arterial sistólica (PAS) e intervalo de pulso (IP), no domínio do tempo e da frequência, de camundongos ELA-2 jovens e idosos. SDNN, desvio-padrão da média de todos os intervalos RR normais; RMSSD, raiz quadrada da média do quadrado das diferenças entre intervalos RR normais; VLF: muito baixa frequência; LF baixa frequência; HF, alta frequência; nu, unidades normalizadas, de camundongos ELA-2 KO jovens (n=4) e idosos (n=6). Dados apresentados como média $\pm$ EPM. Comparação realizada por meio do teste t 42

Tabela 4: Variabilidade da pressão arterial sistólica (PAS) e intervalo de pulso (IP), no domínio do tempo e da frequência, de camundongos ELA-2 idosos tratados com enalapril. SDNN, desvio-padrão da média de todos os intervalos RR normais; RMSSD, raiz quadrada da média do quadrado das diferenças entre intervalos RR normais; VLF, muito baixa frequência; LF baixa frequência; HF, alta frequência; nu, unidades normalizadas. Camundongos ELA-2KO idosos tratados com salina (n=6) e enalapril (n=7). Dados apresentados como média $\pm$ EPM. Comparação realizada por meio do teste t 43

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	18
2 OBJETIVOS	23
2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	23
3 RELAÇÃO DO MATERIAL	25
4 MÉTODOS	26
4.1 ANIMAIS	26
4.2 GENOTIPAGEM	27
4.3 AVALIAÇÃO DOS PARÂMETROS HEMODINÂMICOS.....	29
4.4 ANÁLISE DA VARIABILIDADE DA PRESSAO ARTERIAL SISTOLICA (PAS) E INTERVALO DE PULSO (IP).....	31
4.5 ANÁLISE SIMBÓLICA	32
4.6 ANÁLISE DA SENSIBILIDADE BARORREFLEXA.....	33
4.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	34
5 RESULTADOS	36
5.1 PESO CORPORAL.....	36
5.2 PARÂMETROS HEMODINÂMICOS.....	36
5.2.1. PRESSÃO ARTERIAL MÉDIA	36
5.2.2 FREQUÊNCIA CARDÍACA	39
5.3 VARIABILIDADE DA PRESSÃO ARTERIAL SISTÓLICA (PAS) E INTERVALO DE PULSO (IP)	41
5.4 DINÂMICA SIMBÓLICA.....	47
5.5 SENSIBILIDADE DO BARORREFLEXO ESPONTÂNEO	50
6 DISCUSSÃO	53
7 CONCLUSÃO.....	59
REFERÊNCIAS.....	61

INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

O sistema renina angiotensina (SRA) foi descrito em 1898 no **Instituto Karolinska**, pela equipe do Prof. Robert Tigersted, e participa de inúmeros processos fisiológicos envolvendo os sistemas renal e cardiovascular. Inicialmente, o SRA foi descrito como uma cascata hormonal na qual a renina, produzida e liberada pelas células do aparelho justaglomerular, origina a angiotensina I (ANG I) após atuar sobre seu substrato, o angiotensinogênio. A ANG I, um decapeptídeo, por sua vez, sofre ação da enzima conversora de angiotensina (ECA), e é convertida no octapeptídeo angiotensina II (ANG II) (HERICHOVA; SZANTOOVA, 2013). (Figura 1).

Imagem 1: Representação esquemática dos peptídeos e enzimas participantes do SRA. Enzima conversora de angiotensina (ECA). Enzima conversora de angiotensina 2 (ECA2). Aminopeptidase A (APA). Aminopeptidase N (APN). As setas centrais representam o eixo principal do SRA: Angiotensinogênio, Renina, ANG I, ECA, ANG II, receptores AT₁ e AT₂. As setas pontilhadas representam outros ramos do eixo central, ou seja, geração de angiotensinas, que não ANG II, por outras enzimas, que não a ECA (ECA2, APA, APN). As setas escuras apontam para os respectivos receptores

A ANG II é considerada o principal agente efetor do SRA, e sua atuação se dá por meio da ativação de receptores AT1 e AT2. Esses receptores pertencem à superfamília de receptores de membrana acoplados à proteína G, e são, amplamente, expressos em tecidos, como por exemplo, coração, rins, suprarrenais, cérebro e vasos sanguíneos (DINH et al., 2001). Ao contrário de humanos, ratos e camundongos expressam duas classes de receptores AT1, os quais foram denominados AT1a e AT1b. A ativação de receptores AT1 inicia uma cascata de sinalização intracelular mediada por enzimas como fosfolipase C, inibindo a adenilato ciclase e levando à mobilização do cálcio intracelular (CROWLEY et al., 2005; DINH et al., 2001; MEHTA; GRIENDLING, 2007).

A maior parte dos efeitos da ANG II no sistema cardiovascular é mediada por receptores AT1. É por meio destes receptores que a ANG II exerce direta, ou indiretamente, os seus efeitos clássicos, como por exemplo, inotropismo e cronotropismo positivos cardíacos, vasoconstrição, potencialização da atividade do sistema nervoso simpático (SNS), devido à estimulação da liberação de noradrenalina e inibição de sua recaptação pelos terminais sinápticos simpáticos; além de promover a reabsorção de sódio pelos rins, a liberação de aldosterona, desenvolvimento de fibrose e hipertrofia, e apoptose (BRASCH; SIEROSLAWSKI; DOMINIAK, 1993; BURNISTON et al., 2005; MCKINLEY et al., 2003; PAUL; POYAN MEHR; KREUTZ, 2006a; SCHLÜTER; WENZEL, 2008).

Atualmente, o SRA é descrito sob duas grandes concepções: (I) o SRA circulante, o qual se encontra presente na circulação sanguínea, atuando através da mesma; e (II) o SRA tecidual, o qual possui regulação mais complexa, na qual a ANG II atua como hormônio autócrino ou parácrino, (BADER; GANTEN, 2008; DZAU; BURT; PRATT, 1988; PAUL; POYAN MEHR; KREUTZ, 2006).

Nos últimos anos, diversos trabalhos têm demonstrado que o SRA apresenta complexidade muito maior do que se imaginava; ou seja, alguns peptídeos que eram considerados apenas metabólitos inativos, atualmente têm sua atividade biológica reconhecida. A Ang 1-7, por exemplo, exerce efeitos opostos àqueles mediados pela ANG II, por meio da ativação de receptores MAS (SANTOS et al., 2003b; ZHANG et al., 2018). Outro exemplo é a angiotensina III (ANG III), a qual atua sobre os receptores AT1 e AT2, e promove ações similares à ANG II, preservando cerca de 30% da sua eficiência, e com menor taxa de degradação (FYHRQUIST; SAIJONMAA, 2008).

Embora a ANG II seja gerada, predominantemente, pela ECA, outras vias independentes dessa enzima têm sido descritas, nas últimas décadas, como geradoras alternativas de ANG II (LAVOIE; SIGMUND, 2003). A descoberta dessas vias se deu após estudos mostrarem que pacientes tratados com doses adequadas de inibidores da ECA, não apresentavam a supressão da formação de ANG II, mesmo após o tratamento crônico (FARQUHARSON; STRUTHERS, 2002; JORDE et al., 2000). Essas enzimas alternativas são capazes de gerar ANG II; são serino-proteases sensíveis à quimostatina, tais como a quimase humana (TAKAI et al., 1996; URATA et al., 1990) e a elastase-2 (ELA-2) de ratos e camundongos (BECARI; OLIVEIRA; SALGADO, 2011; PAULA et al., 1998; SANTOS et al., 2002).

A ELA-2 é a única representante da família de proteases 2A que se expressa fora do trato digestório (BECARI; OLIVEIRA; SALGADO, 2011). A ELA-2 foi descrita em diversos tecidos, tais como o leito mesentérico (SANTOS et al., 2003a), carótida (BECARI et al., 2005), coração, pulmões, rins, baço, fígado, e regiões do sistema nervoso central (hipocampo e córtex). Possui alta atividade catalítica na formação de ANG II ($K_{cat}/K_m = 42,5 \mu M^{-1} min^{-1}$), e tem como característica, notória, o fato de não degradar seu produto final a ANG II (PAULA et al., 1998; SANTOS et al., 2002).

Becari et al. Descreveram, recentemente, o papel da ELA-2 no perfil autonômico e hemodinâmico de camundongos (2017). E mostraram que a deleção dessa enzima é capaz de influenciar o balanço simpátovagal, incrementando a atividade parassimpática, e reduzindo a atividade simpática. Os camundongos nocaute para ELA-2 (ELA-2 KO) apresentam menor FC, sem alterações visíveis da pressão arterial média (PAM); possivelmente pela redução da atividade do SRA (BECARI et al., 2017).

Sabe-se que há estreita relação entre a atividade do SRA, e a expectativa de vida (BENIGNI et al., 2009), e que o envelhecimento é o principal fator de mortalidade por doenças cardiovasculares (MOZAFFARIAN et al., 2016). Assim, como em algumas condições fisiopatológicas, o envelhecimento também gera alterações no controle autonômico, caracterizadas pela redução da atividade parassimpática, modificações na circuitaria do sistema acetilcolina (EDMOND DE MEERSMAN et al., 2006; FREELING; LI, 2015), redução da responsividade à estimulação β -adrenérgica em miócitos ventriculares, e consequente diminuição da resposta inotrópica durante a estimulação simpática (RIALS et al., 1998; VETERANS ADMINISTRATION, 1982). Estudos em ratos mostraram que o processo de

envelhecimento reduz, significativamente, a variabilidade da frequência cardíaca (VFC) e da pressão arterial sistólica (PAS), sugerindo a atenuação da modulação autonômica do sistema cardiovascular (DIAS DA SILVA et al., 2006).

Os fármacos que interferem no SRA, especialmente os inibidores da ECA, são amplamente utilizados no tratamento de patologias cardiovasculares, assim como a hipertensão arterial, insuficiência cardíaca, e infarto do miocárdio (BADER; GANTEN, 2008; DZAU et al., 2002). Sabe-se que o tratamento com inibidores da ECA reduz a atividade eferente do nervo simpático (MONTANO et al., 1993), melhora a sensibilidade barorreflexa, tanto em humanos quanto em animais com hipertensão arterial, ou insuficiência cardíaca congestiva (ICHIKAWA et al., 1995; WILLIAMS; KIM, 2003). Sabe-se, também, que a utilização desses inibidores, ou antagonistas dos receptores AT1, também reduzem a morbidade, a mortalidade, e lesões em órgãos-alvo de pacientes com hipertensão arterial ou insuficiência cardíaca, promovendo melhora nas respectivas manifestações clínicas (COHN; TOGNONI; VALSARTAN HEART FAILURE TRIAL INVESTIGATORS, 2001; VARAGIC et al., 2008).

Tendo em vista a participação da ELA-2 no perfil autonômico e hemodinâmico de camundongos, e as alterações características do sistema cardiovascular na senescência, seria interessante a avaliação do perfil cardiovascular de camundongos ELA-2 idosos. O aumento da atividade parassimpática característica dos ELA-2 KO, poderia ser um fator protetor em relação às alterações deletérias características do envelhecimento. Além da avaliação do papel da ELA-2 no envelhecimento, o presente projeto também propõe avaliar o papel da ELA-2, e sua interação com a ECA, em camundongos idosos ELA-2 KO, por meio de um modelo que envolve a atenuação do SRA, como a utilização de inibidores da ECA.

OBJETIVOS

2 OBJETIVOS

O objetivo desse trabalho foi investigar o papel da ELA-2 no fenótipo cardiovascular e autonômico no envelhecimento e avaliar a participação da ECA no envelhecimento dos camundongos ELA-2 KO.

2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

2.1.1 Caracterizar as alterações na pressão arterial, frequência cardíaca e variabilidade da frequência cardíaca em camundongos ELA-2 KO idosos.

2.1.2 Investigar as alterações na função cardiovascular após a inibição da enzima conversora de angiotensina em camundongos ELA-2 KO idosos.

2.1.3. Avaliar modulação autonômica cardíaca nos camundongos ELA-2 KO idosos controles e tratados com enalapril.

2.1.4 Avaliar o controle barorreflexo nos camundongos ELA-2 KO idosos controles e tratados com enalapril.

MATERIAL E MÉTODOS

3 RELAÇÃO DO MATERIAL

1. Agarose Ultra Pura – Invitrogen.
2. Amplificador, modelo ML 866, PowerLab 4/30, ADInstrumentsPty Ltd., New South Wales, Austrália.
3. Angiotensina I humana; Acetate hydrate, Sigma-Aldrich Co, 3050, Spruce Street, St. Louis, EUA.
4. Angiotensina II humana; Synthetic, Sigma-Aldrich Co, 3050, Spruce Street, St. Louis, EUA.
5. Maleato de Enalapril, Sigma Aldrich Co, 3050, Spruce Street, St. Louis, EUA.
6. Micro-Renathane, MRE-025, diâmetro externo 0,64 mm e interno 0,30 mm, Braintree Scientific.
7. Microscópio cirúrgico, modelo MC-A199, D.F. Vasconcellos, Valença, Rio de Janeiro, Brasil.
8. Pentabiótico Veterinário Pequeno Porte – Zoetis, Brasil.
9. Isoflorano - *Isoforine®* - Cristália, Brasil.
10. Iodo povidona alcóolico (PVPI) - .
11. REDExtract-N-Amp; PCR Ready Mix – Sigma-Aldrich, Co, 3050, Spruce Street, St. Louis, EUA).
12. Software, LabChart 7.3.7, ADInstrumentsPty Ltd., New South Wales, Austrália;
13. Solução Salina 0,9%.
14. Sybr Safe; Invitrogen, Thermo Fisher Scientific – Waltham, Massachusetts, EUA.
15. Transdutor de pressão, modelo 6069, Utah Medical Products, Midvale, UT, EUA.
16. Ultrapure DEPC- Treated Water – Invitrogen, Thermo Fisher Scientific – Waltham, Massachusetts, EUA.
17. Oligonucleotídeos – Invitrogen, Thermo Fisher Scientific – Waltham, Massachusetts, EUA.

4 MÉTODOS

4.1 ANIMAIS

Foram utilizados camundongos machos, nocaute para ELA-2 (*ELA-2 KO*), da linhagem C57BL/6J, jovens com idade entre 3 a 4 meses e idosos com idade entre 10 a 12 meses. Os camundongos permaneceram em estantes ventiladas, sob temperatura controlada de $22\pm 1^{\circ}\text{C}$, ciclo claro/escuro de 12h, e livre acesso à água e ração.

Esse projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto-USP. Protocolo 210/2017.

Os animais foram divididos em três grupos:

- 1) Salina: Camundongos ELA-2 KO jovens (Solução salina 0,9%; 0,1ml/dia);
- 2) Salina: Camundongos ELA-2 KO idosos, tratados com salina (Solução salina 0,9%; 0,1ml/dia);
- 3) Enalapril: camundongos ELA-2 KO idosos, tratados com enalapril (15 mg/kg/dia).

O tratamento foi realizado por meio de gavagem, durante 10 dias. No quinto dia após o início do tratamento com enalapril, ou salina, os animais foram submetidos à cateterização da veia jugular e da artéria femoral (procedimento descrito no tópico “Avaliação de parâmetros hemodinâmicos”). (Diagrama 1).

Diagrama 1: Protocolo experimental para o tratamento crônico, com enalapril ou salina, por gavagem.

4.2 GENOTIPAGEM

Todos os animais ELA-2 KO utilizados foram genotipados. Para aquisição do DNA genômico foram coletadas amostras de tecido de 1 a 2 mm, provenientes da orelha ou cauda do camundongo, e adicionadas em tubos com capacidade para 1,5 mL, mantidos em gelo durante o processo. A esses tubos foram adicionados 200 µL de NaOH (50 mM), e os mesmos foram incubados durante 10 minutos a 95° C em banho seco. Em seguida, os tubos foram agitados em vórtex durante 10 segundos, e tiveram adicionados 20 µL tampão Tris-HCl (1 M) pH 8,0. As amostras foram centrifugadas (14000 rpm/ 5 minutos), e o sobrenadante coletado foi utilizado para a amplificação dos genes alvo pela reação em cadeia da polimerase (PCR).

Para realização da PCR, foi utilizado o protocolo multiplex-PCR, onde foram usados três oligonucleotídeos para avaliar, simultaneamente, a presença do alelo selvagem (+/+) e modificado (-/-). Os oligonucleotídeos utilizados na PCR estão descritos abaixo:

- ELA2F(5´AGAACTATGTCTGCTATGTCAC3´);
- Ela2WTr(5´TTTACAGATGAGGAAGTCACC3´);
- pELAlor2(5´TTCTTGAAGTATGGCGAGC3´).

Para reação final com volume de 10 µL foram utilizados: 5 µL de REDextract-N-Amp; 1,2 µL de água ultra pura; 0,6 µL de cada oligonucleotídeo (10 mM) e 2 µL do DNA genômico (100 ng/ µL) por reação. O processo de ciclagem térmica foi dividido em três estágios compostos por:

- 1) 1 ciclo de 3 minutos a 95° C;
- 2) 40 ciclos de amplificação, no qual cada ciclo consistiu de 95° C durante 30 segundos, 60° C durante 40 segundos e 72° C durante 45 segundos;
- 3) 5 minutos à 72° C após o último ciclo de amplificação.

Alíquotas de 5 µL de cada amostra amplificada foram analisadas após corrida por eletroforese em gel de agarose 3% contendo *Sybr Safe*. O peso molecular dos produtos da PCR foram, então, comparados com um marcador de peso molecular de 100 pb. A visualização do cDNA se dá após exposição do gel de agarose a luz

ultravioleta para a detecção da presença de produtos amplificados com tamanhos previamente conhecidos, e então realizada a foto documentação (Imagem 2). Os possíveis resultados obtidos com a genotipagem foram: camundongos nocaute (-/-, amplicon de 295 pb), heterozigotos (+/-, amplicon de 245 pb e 295 pb) e wild-type (+/+, WT, amplicon de 245 pb).

Imagem 2: Gel de agarose 3% corado com Sybr Safe (5 µL/100 mL de agarose) para identificação da presença das bandas referentes aos genes modificado (-) e selvagem (+) em camundongos. (MW) marcador de peso molecular de 100 pb. Animal nocaute (KO) (-/-) e animal heterozigoto (+/-).

4.3 AVALIAÇÃO DOS PARÂMETROS HEMODINÂMICOS

Os camundongos foram anestesiados com anestésico inalatório (Isoflurano - 5% indução e 1,5 - 2% manutenção) e mantidos em temperatura controlada (22 ± 1 °C). Todos os procedimentos cirúrgicos foram realizados utilizando-se microscópio cirúrgico, e em condições assépticas. A artéria femoral direita foi canulada utilizando-se um cateter alongado por meio de ar aquecido, para posterior registro da pressão arterial (PA); e um segundo cateter foi inserido na veia jugular esquerda para infusão de drogas. Os cateteres foram exteriorizados na região posterior (entre as escápulas) dos camundongos, e as incisões suturadas. Após a cirurgia, os animais receberam uma dose de pentabiótico (24.000 UI/Kg, i.m.), e foram colocados em caixas individuais, para recuperação pós-cirúrgica, durante 5 dias.

No dia do registro da pressão arterial (PA), cerca de 30 minutos antes do início dos experimentos, os camundongos foram levados, para adaptação, a uma sala sem ruídos, visando minimizar o estresse dos animais. O cateter arterial foi conectado ao transdutor de pressão para registro da PA pulsátil. O sinal elétrico foi amplificado, e enviado a um computador conectado ao sistema de registro PowerLab. A PA pulsátil foi, continuamente, amostrada (4 kHz) durante o período de 30 a 40 min para o registro basal; e, em seguida, seguiu-se o protocolo de administração conforme mostrado no Diagrama 2: administração de salina 0,9%, para limpeza e confirmação da viabilidade do cateter venoso; intervalo de cerca de 5 minutos; e, então, administração *in bolus* de 10 µL de ANG I (solução 10,0 µg/mL). Aguardou-se a PA e FC retornarem aos valores basais, e, então, foi feita a administração *in bolus* ANG II (solução 10,0 µg/mL). A administração de ANG I se deu para verificar a eficácia do tratamento com inibidor da ECA, conforme pode ser observado que a resposta a ANG I nos camundongos que receberam inibidor da ECA foi aproximadamente 57% menor comparado com o grupo que recebeu salina. A administração *in bolus* de ANG II foi realizada como controle pois a ANG II é o peptídeo biologicamente ativo e não precisa ser convertida.

Diagrama 2: Protocolo experimental de registro hemodinâmico e administração intravenosa de salina, ANG I e ANG II.

A seguir são apresentados os registros hemodinâmicos, ilustrativos, de um camundongo ELA-2 KO após o tratamento com salina (imagem 3) e tratamento crônico com enalapril (15 mg/kg/dia, durante 10 dias; imagem 4). Nesses registros apresentamos o efeito da administrado in bolus via jugular de ANG I e ANG II.

Imagem 3: Registro hemodinâmico de um camundongo ELA-2 KO controle, após o tratamento crônico com salina 0,9% (0,1 mL, durante 10 dias).

Imagem 4: Registro hemodinâmico de um camundongo ELA-2 KO após tratamento crônico com enalapril (15 mg/kg/dia, durante 10 dias).

4.4 ANÁLISE DA VARIABILIDADE DA PRESSÃO ARTERIAL SISTOLICA (PAS) E INTERVALO DE PULSO (IP)

Os registros da PA foram analisados por um programa computacional que detecta pontos de inflexão a partir dos sinais gerados pelo sistema de registro. (LabChart 7.0, ADInstruments, Sydney, Australia). Foram geradas séries temporais, batimento a batimento, da PAS, e IP calculadas utilizando os intervalos consecutivos de valores de PAS. Todas as séries temporais foram obtidas de registros referentes ao período basal (30 - 40 minutos). A modulação autonômica, cardíaca e da PA, foi investigada mediante a análise da variabilidade da frequência cardíaca (VFC) e da PAS no domínio do tempo e da frequência. No domínio do tempo, a variabilidade da PAS foi quantificada por meio do desvio padrão de valores sucessivos de PA (SD). A variabilidade do IP foi quantificada pelo desvio padrão de valores sucessivos (SDNN), e pela raiz quadrada da média da soma dos quadrados das diferenças entre sucessivos valores de IP (RMSSD). A variabilidade da PAS e IP também foi examinada no domínio da frequência, por meio da análise espectral. As séries temporais, batimento a batimento, da PAS e IP foram interpoladas em 10 Hz, e divididas em segmentos contínuos de 512 batimentos, sobrepostos em 50%. Cada segmento foi submetido a um janelamento do tipo Hanning, e à análise espectral, pela transformada rápida de Fourier (FFT), utilizando-se o programa computacional *CardioSeries v2.4*:

(<http://www.danielpenteado.com/cardioseries>).

Os componentes oscilatórios encontrados foram quantificados em bandas de baixa (LF: 0,20 a 1,0 Hz) e alta frequência (HF: 1,0 a 5,0 Hz) (Fazan Jr e cols., 2005).

4.5 ANÁLISE SIMBÓLICA

Para avaliação da modulação autonômica cardíaca foi utilizada, também, uma abordagem não linear denominada dinâmica simbólica. As séries de IP e PAS foram divididas em segmentos de sobreposição de 300 pontos. Em seguida, cada segmento foi uniformemente distribuído entre os seis níveis (de 0 a 5) de acordo com os valores máximo e mínimo dos IPs. Então, foram criadas sequências de três (trincas) de valores consecutivos, quando todos os pontos dentro do mesmo nível recebem o mesmo símbolo. Posteriormente, as sequências de três símbolos consecutivos (palavras) foram avaliadas, e classificadas de acordo com seu padrão de variação. Todas as trincas criadas foram agrupadas dentro de 4 famílias: **a)** 0V: quando os três símbolos são iguais; **b)** 1V: quando dois símbolos consecutivos são iguais e um símbolo é diferente; **c)** 2LV: quando há duas variações semelhantes, variando de forma ascendente ou descendente; **d)** 2UV: quando ocorrem duas variações diferentes, nas quais todos os três símbolos estão espalhados em forma de pico ou vale (Imagem 5). Todo padrão ocorre dentro dessas quatro famílias; e, após essa caracterização, a porcentagem de padrões de ocorrência, em cada família, é usada para análise, sendo que a sua soma resulta em 100% (Porta e cols., 2002).

Imagem 5: Representação de exemplos de padrões 0V, 1V, 2LV e 2UV. Adaptada de Porta e cols., 2007.

4.6 ANÁLISE DA SENSIBILIDADE BARORREFLEXA

A função barorreflexa espontânea foi estimada por meio da técnica da sequência, utilizando o programa computacional *CardioSeries v2.4*

(<http://www.danielpenteado.com/cardioseries>)

Primeiro, todas as rampas de pressão, ascendente ou descendentes com duração mínima de 4 batimentos consecutivos, foram identificadas nas séries de PAS. Após isso, para cada rampa de pressão procurou-se identificar se havia uma rampa de IP correspondente (na mesma direção), deslocada de um batimento (*delay* = 1) entre elas. Quando isso ocorria, dizia-se que foi identificada uma sequência barorreflexa espontânea, composta pelos pares de valores de PAS x IP das duas rampas. Uma regressão linear entre os valores de PAS e IP foi calculada para cada sequência identificada, e o coeficiente angular desta regressão foi utilizado como índice de sensibilidade (ganho) do barorreflexo espontâneo. Além disso, o número total de sequências, e o número de sequências “up” (PAS aumenta) e “down” (PAS diminui) foram normalizados por 1000 batimentos; enquanto o índice de efetividade do barorreflexo (BEI) foi calculado pela razão entre o número de sequências e o

número total de rampas de PA (REFERENCIA). Interpreta-se o BEI como sendo a porcentagem de rampas de PA, a qual, efetivamente, produz uma resposta pelo barorreflexo (DI RIENZO et al., 2001)

4.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os efeitos da deleção do gene para ELA-2 sobre a PAM, PAS, FC, potência da banda de LF (baixa frequência) do espectro da PAS, potências das bandas de LF e HF (alta frequência) do espectro do IP, e a razão LF/HF foram comparadas entre os grupos ELA-2 KO jovens e ELA-2 KO idosos por meio do teste t não pareado, seguido de teste de Welch, quando necessário. Para a comparação entre os grupos de camundongos idosos tratados com salina, ou enalapril, e camundongos jovens, foi utilizada a análise de variância simples (ANOVA “*One Way*”), seguida de pós-teste de *Student-Newman-Keuls*, quando necessário. O nível de significância adotado foi sempre $p < 0,05$. O programa *GraphPad Prism 7.0* foi utilizado para as análises estatísticas e elaboração dos gráficos. Os resultados são apresentados com média $\pm$ EPM (erro padrão da média).

RESULTADOS

5 RESULTADOS

5.1 PESO CORPORAL

Os camundongos ELA-2 KO jovens ($26 \pm 1,7$) apresentaram menor peso corporal quando comparados com os camundongos idosos ($33 \pm 1,3$) (Figura 1). Não há diferença entre o peso corporal dos animais idosos que receberam salina, quando comparados aos tratados com enalapril ($30 \pm 0,8$).

Figura 1: Peso corporal (g) de camundongos ELA-2 KO jovens, idosos, e idosos tratados cronicamente com enalapril por 10 dias. Comparações realizadas por meio do teste **ANOVA** de uma via. Dados apresentados como média $\pm$ EPM. * $p < 0,05$.

5.2 PARÂMETROS HEMODINÂMICOS

5.2.1. PRESSÃO ARTERIAL MÉDIA.

Os valores de PAM de camundongos ELA-2 KO jovens e idosos são semelhantes (Figura 2).

Figura 2: Pressão Arterial Média (mmHg), de camundongos elastase-2 jovens (n=4) e idosos (n=6). Dados apresentados como média $\pm$ EPM. Comparação realizada por meio do teste *t*.

Os camundongos idosos que receberam enalapril apresentaram PAM basal menor do que os idosos do grupo salina (Figura 3). Adicionalmente, e como esperado, os camundongos idosos tratados com enalapril apresentaram menor resposta pressórica após a administração de ANG I (Tabela 1 e Figura 4a), evidenciando que o tratamento crônico com enalapril foi eficaz na inibição da ECA. Não houve diferença entre os grupos idosos controle e tratados com enalapril quanto aos valores pressóricos após a administração de ANG II (Figura 4b).

Figura 3: Pressão Arterial Média (mmHg) de camundongos ELA-2 KO após 10 dias de tratamento por gavagem com salina (n=6) e enalapril (n=7). Dados apresentados como média $\pm$ EPM. Comparação realizada por meio do teste *t*.

Tabela 1: Pressão arterial média (PAM) basal; variação (Δ) da PAM em resposta à administração de ANG I; e em resposta à administração de ANG II. Dados apresentados como média $\pm$ EPM. Comparação realizada por meio do teste *t*.

	Salina	Enalapril	p-valor
PAM (mmHg)	112 $\pm$ 1,8	100 $\pm$ 2,3	0,0032
Δ PAM Ang I (mmHg)	35 $\pm$ 2,1	15 $\pm$ 1,7	<0,0001
Δ PAM Ang II (mmHg)	37 $\pm$ 3,4	42 $\pm$ 3,0	ns

A variação (Δ) da PAM em resposta à ANG I nos camundongos ELA-2 KO idosos tratados com enalapril foi, aproximadamente, 58% menor do que nos camundongos idosos que receberam salina (Tabela 1; Figura 4a). Isso indica que a menor resposta pressórica à ANG I, no grupo enalapril, não é devida aos menores níveis pressóricos encontrados durante o período basal; mas sim, à eficácia do tratamento com o inibidor da ECA. Não houve diferença entre os valores de PAM após a administração de ANG II entre os grupos de camundongos idosos (Figura 4b).

Figura 4: Efeito do tratamento com enalapril sobre a resposta pressórica à administração de ANG I e ANG II. (a) variação (Δ) da pressão arterial média (PAM) após administração de ANG I; (b) Δ de PAM após a administração de ANG II, em camundongos elastase 2-KO idosos, cronicamente tratados com salina ($n = 6$), ou enalapril ($n = 7$). Dados apresentados como média $\pm$ EPM. Comparação realizada por meio do teste t. * $p < 0,05$.

5.2.2 FREQUÊNCIA CARDÍACA

Assim como observado para a PAM, os camundongos ELA-2 KO idosos não apresentaram alterações da frequência cardíaca quando comparados com os KO jovens (Figura 5). Curiosamente, observou-se que nos camundongos ELA-2 KO idosos, tratados cronicamente com enalapril, resultou no aumento da frequência cardíaca basal, quando comparados com os camundongos ELA-2 KO idosos que receberam salina (Figura 6, tabela 2).

Figura 5: Frequência cardíaca basal de camundongos elastase 2-KO jovens (n=4) e idosos (n=6). Dados apresentados como média $\pm$ EPM. Comparação realizada por meio do teste t.

Figura 6: Frequência cardíaca basal de camundongos ELA-2 KO após o tratamento crônico com enalapril (n=7) ou salina (n=6). Dados apresentados como média $\pm$ EPM. Comparação realizada por meio do teste t. * $p > 0,05$.

Tabela 2: Frequência cardíaca de camundongos ELA-2 KO. FC basal. Dados apresentados como média $\pm$ EPM. Comparação realizada por meio do teste t.* $p < 0,05$: camundongos idosos ELA-2 KO tratados com enalapril versus tratados com salina.

	FC (bpm)	n	p-valor
Jovens	559 $\pm$ 19	4	ns
Idosos	535 $\pm$ 31	6	-
Idosos T.	639 $\pm$ 10	7	0,0055

5.3 VARIABILIDADE DA PRESSÃO ARTERIAL SISTÓLICA (PAS) E INTERVALO DE PULSO (IP)

Os dados referentes à avaliação da variabilidade dos espectros da PAS e do IP, tanto no domínio do tempo (SDNN e RMSSD) quanto no domínio da frequência (análise espectral), estão apresentados nas Tabelas 3 e 4.

Em relação ao domínio do tempo, o SDNN e o RMSSD possuem valores similares entre os grupos de animais jovens e idosos. Também não foram encontradas alterações significativas entre os camundongos ELA-2 KO jovens e idosos quanto aos parâmetros avaliados no domínio da frequência (VLF, LF, HF em valores absolutos, unidades normalizadas, e razão LF/HF), como demonstrado na Tabela 3.

Tabela 3: Variabilidade da pressão arterial sistólica (PAS) e intervalo de pulso (IP), no domínio do tempo e da frequência, de camundongos ELA-2 jovens e idosos. SDNN, desvio-padrão da média de todos os intervalos RR normais; RMSSD, raiz quadrada da média do quadrado das diferenças entre intervalos RR normais; VLF: muito baixa frequência; LF baixa frequência; HF, alta frequência; nu, unidades normalizadas, de camundongos ELA-2 KO jovens (n=4) e idosos (n=6). Dados apresentados como média $\pm$ EPM. Comparação realizada por meio do teste t

	Jovens	Idosos	p-valor
Variabilidade do IP			
SDNN, ms	9,2 $\pm$ 1,0	6,6 $\pm$ 1,3	ns
RMSSD, ms	5,2 $\pm$ 1,1	3,5 $\pm$ 0,9	ns
VLF, ms	13,6 $\pm$ 4,0	7,2 $\pm$ 1,9	ns
LF, ms ²	13,7 $\pm$ 1,9	5,2 $\pm$ 1,1	ns
HF, ms ²	4,9 $\pm$ 1,3	2,2 $\pm$ 0,6	ns
LF, un	71,5 $\pm$ 4,8	66,3 $\pm$ 2,0	ns
HF, un	28,5 $\pm$ 4,8	33,7 $\pm$ 2,0	ns
LF/HF	3,4 $\pm$ 0,9	2,6 $\pm$ 0,3	ns
Variabilidade da PAS			
SDNN, mmHg	2,5 $\pm$ 0,9	2,9 $\pm$ 0,3	ns
LF, mmHg	7,6 $\pm$ 2,0	4,9 $\pm$ 0,6	ns

Os camundongos ELA-2 KO idosos tratados cronicamente com enalapril, quando comparados com camundongos idosos tratados com solução salina, não apresentaram alterações nos parâmetros de variabilidade, tanto da PAS, quanto de IP. Não foram observadas diferenças nos valores referentes à avaliação da variabilidade no domínio do tempo (SDNN e RMSSD). Também não foram observadas diferenças nas potências do espectro de LF e HF (Tabela 4).

Tabela 4: Variabilidade da pressão arterial sistólica (PAS) e intervalo de pulso (IP), no domínio do tempo e da frequência, de camundongos ELA-2 idosos tratados com enalapril. SDNN, desvio-padrão da média de todos os intervalos RR normais; RMSSD, raiz quadrada da média do quadrado das diferenças entre intervalos RR normais; VLF, muito baixa frequência; LF baixa frequência; HF, alta frequência; nu, unidades normalizadas. Camundongos ELA-2KO idosos tratados com salina (n=6) e enalapril (n=7). Dados apresentados como média $\pm$ EPM. Comparação realizada por meio do teste t.

	Salina	Enalapril	p-valor
Variabilidade do IP			
SDNN, ms	6,6 $\pm$ 1,3	5,8 $\pm$ 0,5	ns
RMSSD, ms	3,5 $\pm$ 0,9	2,9 $\pm$ 0,3	ns
VLF, ms	7,2 $\pm$ 1,9	7,3 $\pm$ 1,3	ns
LF, ms ²	5,2 $\pm$ 1,1	7,5 $\pm$ 2,0	ns
HF, ms ²	2,2 $\pm$ 0,6	2,6 $\pm$ 0,5	ns
LF, un	66,3 $\pm$ 2,0	67,1 $\pm$ 2,8	ns
HF, un	33,7 $\pm$ 2,0	32,9 $\pm$ 2,8	ns
LF/HF	2,6 $\pm$ 0,3	2,2 $\pm$ 0,3	ns
Variabilidade da PAS			
SDNN, mmHg	2,9 $\pm$ 0,3	5,0 $\pm$ 0,2	ns
LF, mmHg	4,9 $\pm$ 0,6	6,6 $\pm$ 1,3	ns

Não foram observadas diferenças entre camundongos ELA-2 KO jovens e idosos, quanto à variabilidade do espectro da PAS e densidade da potência da banda de LF (figura 7) .

Figura 7: Pressão arterial sistólica (PAS; **painel a**) de camundongos ELA-2 KO e potência da banda de baixa frequência (LF; **painel b**) do espectro da pressão arterial sistólica de camundongos elastase 2-KO jovens (n=4) e idosos (n=6). LF: Baixa frequência. Dados apresentados como média $\pm$ EPM. Comparação realizada por meio do teste t.

A inibição da ECA reduziu, significativamente ($p=0,0009$), a PAS dos camundongos ELA-2 KO idosos (Figura 8a). Entretanto, não houve diferença entre os tratados com enalapril versus salina (controles) com relação à potência da banda de LF no espectro da PAS (Figura 8b).

Figura 8: Pressão arterial sistólica (**PAS**; **painel a**) de camundongos ELA 2-KO idosos e Potência da banda de baixa frequência (**LF**; **painel b**) do espectro da pressão arterial sistólica no domínio da frequência de camundongos elastase 2-KO tratados com salina (controle, $n=6$) ou enalapril ($n=7$). **LF**: Baixa frequência. Dados apresentados como média $\pm$ EPM. Comparação realizada por meio do teste t^* $p < 0,05$.

Interessantemente, os camundongos ELA-2 KO idosos não apresentaram diferenças entre as potências das bandas de LF, HF e razão LF/HF do espectro do IP quando comparados com os camundongos ELA-2 KO jovens (Figura 9). Sugerindo que a deleção do gene responsável pela expressão da Elastase-2 protege a alteração do balanço simpátovagal observado no envelhecimento.

Figura 9: Variabilidade do intervalo de pulso, no domínio da frequência, de camundongos elastase 2-KO jovens e idosos. Painel a: Potência da banda de HF em unidades normalizadas (nu); **Painel b:** potência da banda de LF em unidades normalizadas (nu); **Painel c:** Razão entre as potências das bandas de LF e HF. Camundongos ELA-2 KO jovens (n=4) e idosos (n=6). HF: alta frequência; LF: baixa frequência. Dados apresentados como média $\pm$ EPM, * $p < 0,05$, teste t.

Quando comparadas as potências das bandas de LF e HF de camundongos idosos ELA-2 KO que receberam salina, com os que receberam enalapril, não foram encontradas alterações significativas (Figura 10a e 10b). Também não houve alteração na razão LF/HF (Figura 10c) entre esses grupos. Além disso, não foram encontradas alterações nas potências das bandas de LF e HF.

Figura 10: Variabilidade do intervalo de pulso, no domínio da frequência, de camundongos ELA-2 KO jovens e idosos tratados com salina ou enalapril. Painel a: (a) Potência da banda de **HF** em unidades normalizadas (nu); **Painel b:** potência da banda de **LF** em unidades normalizadas (nu); **Painel c:** Razão entre as potências da banda de **LF** e **HF** do espectro do intervalo de pulso (**IP**). Camundongos ELA-2 KO tratados com enalapril (n=6) ou salina (n=7). **HF:** banda de alta frequências; **LF:** banda de baixa frequência. Dados apresentados como média $\pm$ EPM. Comparação realizada por meio do teste t.

5.4 DINÂMICA SIMBÓLICA

Uma outra ferramenta para a análise do balanço simpatovagal é a análise simbólica. A ocorrência dos padrões da dinâmica simbólica do espectro da PAS é similar entre os camundongos ELA-2 KO jovens e idosos, como observado na Figura 11. Também não foram observadas diferenças entre a ocorrência de padrões da dinâmica simbólica do IP (Figura 12).

Figura 11: Análise simbólica do espectro da pressão arterial sistólica (PAS) de camundongos ELA-2 KO jovens (n=4) e idosos (n=6). Painei a: 0V: três símbolos iguais indicando modulação simpática; Painei b: 1V: uma variação, dois símbolos iguais e um diferente, indicando tanto modulação simpática quanto parassimpática; Painei c: 2LV: duas variações semelhantes, indicando modulação parassimpática; Painei d: 2UV: duas variações diferentes indicando modulação parassimpática. Dados apresentados como média $\pm$ EPM. Comparação realizada por meio do teste -t.

Figura 12: Análise simbólica do espectro do intervalo de pulso (IP) de camundongos ELA-2 KO jovens (n=4) e idosos (n=6). Painel a: 0V: três símbolos iguais indicando modulação simpática; Painel b: 1V: uma variação, dois símbolos iguais e um diferente, indicando tanto modulação simpática quanto parassimpática; Painel c: 2LV: duas variações semelhantes, indicando modulação parassimpática; Painel d: 2UV: duas variações diferentes indicando modulação parassimpática. Dados apresentados como média ± EPM. Comparação realizada por meio do teste t. *p < 0,05.

Na avaliação do espectro da PAS, não observou-se alteração na ocorrência de nenhum dos padrões avaliados em relação ao grupo salina (Figura 13). Também não foram encontradas diferença na ocorrência de nenhum dos padrões examinados no espectro do IP após o tratamento com enalapril em camundongos ELA-2 KO idosos (Figura 14).

Figura 13: Análise simbólica do espectro da pressão arterial sistólica (PAS) de camundongos ELA-2 KO após o tratamento crônico com enalapril (n=7) ou salina (n=6). Painel a: 0V: três símbolos iguais indicando modulação simpática; Painel b: 1V: uma variação, dois símbolos iguais e um diferente, indicando tanto modulação simpática quanto parassimpática; Painel c: 2LV: duas variações semelhantes, indicando modulação parassimpática; Painel d: 2UV: duas variações diferentes indicando modulação parassimpática. Dados apresentados como média ± EPM. Comparação realizada por meio do teste t. *p < 0,05.

Figura 14: Análise simbólica do espectro do intervalo de pulso (IP) de camundongos ELA-2 KO após tratamento crônico com enalapril ou salina. Painel a: 0V: três símbolos iguais indicando modulação simpática; **Painel b: 1V:** uma variação, dois símbolos iguais e um diferente, indicando tanto modulação simpática quanto parassimpática; **Painel c: 2LV:** duas variações semelhantes, indicando modulação parassimpática; **Painel d: 2UV:** duas variações diferentes indicando modulação parassimpática. Dados apresentados como média $\pm$ EPM. Comparação realizada por meio do teste t.

5.5 SENSIBILIDADE DO BARORREFLEXO ESPONTÂNEO

Comparados com camundongos ELA-2 KO jovens, os animais idosos não possuem diferenças no ganho do barorreflexo (Figura 15a); porém, observa-se redução do BEI (Figura 15b), mostrando que a efetividade da resposta barorreceptora está diminuída.

Figura 15: Índices de sensibilidade do barorreflexo espontâneo de camundongos ELA-2 KO. Painel a: Ganho do barorreflexo espontâneo (ms/mmHg); **Painel b:** Índice da efetividade barorreflexa (BEI) de camundongos ELA-2 KO jovens (n=4) e idosos (n=6). Dados apresentados como média $\pm$ EPM. Comparação realizada por meio do teste t. *p < 0,05.

Não foram observadas diferenças nos índices de sensibilidade (ganho) e de efetividade barorreflexa (bei) entre os camundongos KO idosos que receberam tratamento com salina ou enalapril (Figura 16).

Figura 16: Índices de sensibilidade do barorreflexo espontâneo de camundongos ELA-2 KO idosos após o tratamento com enalapril. Painel a: Ganho do barorreflexo espontâneo (ms/mmHg); **Painel b:** Índice da efetividade barorreflexa (BEI) de camundongos ELA-2 KO tratados cronicamente com enalapril (n=7) e salina (n=6).

DISCUSSÃO

6 DISCUSSÃO

No presente estudo observou-se que os camundongos ELA-2 KO idosos apresentaram os mesmos valores de PA e FC, bem como os valores da densidade da potência das bandas de LF e HF, no espectro da PAS e IP quando comparados com camundongos ELA-2 KO jovens. É interessante esse achado que a deleção do gene da elastase-2, enzima tecidual formadora de ANG II, não altera os parâmetros hemodinâmicos e simpatovagal com envelhecimento. O envelhecimento, de fato, está associado ao comprometimento da regulação da PA, expresso por aumento da variabilidade deste parâmetro hemodinâmico (LAITINEN et al., 2004), por alterações no sistema acetilcolina (ACh) (FREELING; LI, 2015), e redução da atividade parassimpática cardíaca (CORBETT et al., 2007; FREELING; LI, 2015).

O nosso grupo de pesquisa desenvolveu, e caracterizou, a linhagem de camundongos ELA-2 KO (BECARI ET al., 2017). Becari et al. (2017a) mostraram que a ausência da elastase-2 leva a alterações no balanço simpatovagal, com redução da densidade da potência da banda de LF e aumento da banda de HF, sugerindo redução da atividade simpática, e aumento da atividade parassimpática. Alterações como essas podem se refletir em parâmetros hemodinâmicos, como PA e a FC; tendo sido observado no estudo citado acima, que os camundongos ELA-2 KO apresentam redução da FC, quando comparados com camundongos selvagens. O processo de envelhecimento também é caracterizado por alterações no sistema cardiovascular e atividade do sistema nervoso autônomo (SNA). A senescência é marcada pelo aumento da atividade simpática e do estresse oxidativo, e o declínio do controle parassimpático no coração (CORBETT et al., 2007; DIAS DA SILVA et al., 2006; EDMOND DE MEERSMAN et al., 2006). Baseando-se nessas informações, buscou-se neste estudo, a investigação das alterações do perfil cardiovascular e autonômico de camundongos ELA-2 KO idosos, e o papel da ECA no envelhecimento de camundongos com deleção desta enzima, ou seja, a ELA-2.

O mecanismo primário pelo qual o SNA regula a PA é o barorreflexo. Estudos em humanos demonstraram que a sensibilidade barorreflexa se apresenta atenuada na senescência (LAITINEN et al., 1998; MONAHAN et al., 2001), bem como na hipertensão arterial (GRIBBIN et al., 1971; LAGE et al., 1993). O BEI foi descrito como o número de sequências divididas pelo número de rampas de PA, sendo a porcentagem de rampas de PA que efetivamente produzem uma resposta mediada

pelo barorreflexo (DI RIENZO et al., 2001). A semelhança entre o perfil hemodinâmico, e autonômico, de camundongos ELA-2 KO envelhecidos e animais jovens, poderia indicar uma possível participação da ELA-2 como um dos componentes envolvidos no comprometimento cardiovascular na senescência, em camundongos. Neste estudo foi observado que não existem diferenças na sensibilidade barorreflexa entre os grupos investigados; entretanto, em camundongos ELA-2 KO idosos, comparados com jovens, observa-se redução do BEI, entendido como a efetividade do barorreflexo.

O envelhecimento é o principal fator de mortalidade por doenças cardiovasculares (MOZAFFARIAN et al., 2016), existindo estreita relação entre a atividade do SRA e o aumento da expectativa de vida; como demonstrado pelo aumento da longevidade em camundongos com deficiência de receptores AT1a (BENIGNI et al., 2009). Já está bem estabelecido que os inibidores da ECA promovem diversos efeitos benéficos em patologias cardiovasculares, tais como, aumento da sobrevida pós-infarto do miocárdio, retardo da progressão da insuficiência cardíaca por meio do controle da hipertensão arterial, doença renal crônica e nefropatia diabética; estes são alguns dos benefícios da utilização de inibidores da ECA (DÜSING, 2016). Esses fármacos são comumente utilizados como agentes vasodilatadores, pois reduzem a resistência periférica total, reduzindo a biodisponibilidade de ANG II e aumentando a biodisponibilidade de bradicinina. Para este estudo foi utilizado o enalapril, buscando investigar as possíveis alterações no fenótipo cardiovascular de camundongos ELA-2 KO idosos após a inibição da ECA, ou seja, a principal via de geração de ANG II.

Como esperado, o tratamento crônico com enalapril reduziu a PAM de camundongos idosos. Um outro estudo mostrou resultados semelhantes, assim como o observado em ratos envelhecidos após o tratamento crônico com captopril (DIAS DA SILVA et al., 2006). Alterações agudas da PA associadas ao tratamento com inibidores da ECA estão relacionadas com a atividade da renina plasmática e concentrações circulantes de ANG II antes do tratamento; de tal maneira, que indivíduos com maior atividade da renina plasmática são os que apresentam maiores reduções da PA em resposta à inibição da ECA (CASE et al., 1980; GIVEN et al., 1984; WAEBER et al., 1980, 1982). Apesar das atividades da renina e da ECA (tecidual e plasmática) não terem sido avaliadas nesse estudo, a atenuação (58%) da resposta pressora induzida pela ANG I indicou que o tratamento crônico foi

efetivo na inibição da ECA; possivelmente pela diminuição da atividade do SRA, redução da concentração de ANG II, e o aumento da disponibilidade da bradicinina (CAMPBELL, 2018).

Curiosamente, observou-se que após o tratamento com enalapril, ocorreu o aumento da FC nos camundongos idosos. É conhecido que a ANG II promove efeitos inotrópicos e cronotrópicos positivos no coração (KOBAYASHI; FURUKAWA; CHIBA, 1978; MORAVEC et al., 1990); em parte, devido à sua atuação nos sistemas nervoso central (SNC) e periférico, a qual se dá por meio da ativação de receptores AT1, aumentando a síntese e liberação de noradrenalina, inibindo o barorreflexo (BRASCH; SIEROSLAWSKI; DOMINIAK, 1993; MCKINLEY et al., 2003; PAUL; POYAN MEHR; KREUTZ, 2006b).

No cenário apresentado onde os camundongos idosos possuem deleção de uma via alternativa de geração de ANG II (ELA-2), e foram tratados com inibidor da ECA, o aumento da FC é algo inesperado. Isso porque, uma das características dos inibidores da ECA é que eles reduzem a resistência vascular periférica, sem causar aumento compensatório da FC (IBSEN et al., 1983; LUND-JOHANSEN; OMVIK, 1984); consequentemente, não provocam taquicardia reflexa (GIUDICELLI et al., 1985). Porém, em estudo comparativo entre a influência de alguns inibidores da ECA sobre parâmetros da VFC, sugeriu-se que a administração aguda de enalapril em ratos acordados, imobilizados, ocorre aumento da FC e do tônus simpático, e redução da atividade parassimpática (FATEEV et al., 2012).

A VFC pode ser examinada tanto no domínio tempo, por meio de uma avaliação mais global, utilizando-se ferramentas estatísticas; bem como no domínio da frequência onde se analisa a potência espectral, permitindo uma caracterização quantitativa, individual, e simultânea, em termos relativos e absolutos, da atividade tanto do sistema nervoso parassimpático (SNP), quanto do sistema nervoso simpático (SNS) (TASK FORCE, 1996).

A avaliação no domínio do tempo da variabilidade do IP e da PAS, pode ser realizada por meio do cálculo do desvio padrão da média de todos os intervalos RR normais (SDNN), o qual representa a variabilidade total do IP ou PAS; enquanto que a raiz quadrada da média da soma dos quadrados das diferenças entre sucessivos batimentos (RMSSD) reflete a atividade parassimpática sob o coração (TASK FORCE, 1996).

Embora os camundongos ELA-2 KO que receberam o enalapril tenham apresentado redução da PAS (POOL et al., 1987; TODD; HEEL, 1986; VIDT et al., 1982), não foram observadas alterações no SDNN e RMSSD. Também não foram detectadas alterações quanto a potência espectral de baixa e alta frequência, o que poderia sugerir que o tratamento não foi capaz de alterar o balanço simpátovagal de camundongos idosos.

Entretanto, por ser um método linear, a análise espectral apresenta desvantagens, uma vez que nesse modelo de análise, consideram-se as séries temporais do IP apenas como uma combinação de componentes oscilatórios independentes, negligenciando-se a interação entre esses componentes (SILVA et al., 2017). Portanto, também foi realizada nesse estudo a investigação da VFC utilizando-se um método não-linear, a chamada análise simbólica (PORTA et al., 2001).

Na análise simbólica, diferentemente da análise espectral, assume-se a linearidade, e ocorre a avaliação de pequenas sequências de valores. Assim como descrito na sessão métodos da presente Dissertação (Sessão 4.6), as séries de IP e PAS são divididas em segmentos, os quais são distribuídos entre seis níveis (de 0 a 5); e então, são criadas sequências de três (trincas) valores consecutivos. As sequências de três símbolos consecutivos (palavras) são avaliadas, e classificadas, de acordo com seu padrão de variação, e as trincas são, então, agrupadas dentro de 4 famílias, a saber, 0V, 1V, 2LV e 2UV.

A ocorrência de padrões 0V está relacionada com a atividade simpática, enquanto que 2LV e 2UV refletem a atividade parassimpática (PORTA et al., 2007). Mesmo sendo considerado não significativo desde o início dos estudos da análise simbólica, o padrão 1V é bastante semelhante aos padrões que compõem a família 0V; exceto pelo fato de apresentar dois símbolos iguais seguido por símbolo diferente ao final da trinca (SILVA et al., 2017).

Atualmente, estudos sugerem que a ocorrência de padrões 1V pode ser um índice consistente da modulação simpática, devido a associação desses padrões com ritmos mais lentos de IP. Em modelos experimentais de falência cardíaca congestiva em ratos, foi observada a redução da ocorrência de padrões 0V e 1V, corroborando com a diminuição da atividade simpática observada nesse modelo fisiopatológico (SILVA et al., 2017; TOBALDINI et al., 2009). Devido à FC mais rápida, e escalas temporais mais curtas de controle autônomo em roedores, do que

humanos, o padrão 1V pode representar a modulação simpática, melhor do que o padrão 0V em ratos e camundongos (SILVA et al., 2017).

Entretanto, o tratamento com enalapril, além de não alterar a potência das bandas de alta e baixa frequência, também não alterou a ocorrência de nenhum dos padrões investigados por meio da análise simbólica, sugerindo que a inibição da ECA em camundongos ELA-2 KO idosos, não interfere no fenótipo autonômico. Curiosamente, esses achados se assemelham a resultados encontrados em estudos sobre a VFC de ratos adultos jovens, onde a inibição do SRA promoveu nenhum efeito (GRICHOIS et al., 1992) ou o aumento da atividade simpática (PONCHON; ELGHOZI, 1996), enquanto que o contrário foi observado em ratos idosos, onde o tratamento crônico com captopril, alterou o balanço simpatovagal, aumentando o tônus parassimpático (DIAS DA SILVA et al., 2006).

No presente estudo não foram encontradas diferenças nos índices de sensibilidade e efetividade barorreflexa entre os camundongos idosos tratados com enalapril, quando comparados com camundongos idosos controle, assim como o esperado, uma vez que os inibidores da ECA não alteraram a função barorreceptora (DÜSING et al., 1987).

Em conjunto nossos dados mostraram que em camundongos ELA-2 KO idosos apresentam perfil hemodinâmico e autonômico similar ao de camundongos jovens da mesma linhagem, salvo a redução da efetividade barorreflexa observada no grupo idoso, e que o tratamento com inibidor da ECA em camundongos idosos, embora altere significativamente PAM e FC, não promove alterações significativas no perfil autonômico.

CONCLUSÃO

7 CONCLUSÃO

Os camundongos ELA-2 KO idosos apresentam fenótipo cardiovascular e autonômico bastante similar ao de camundongos jovens da mesma linhagem, sugerindo que a ELA-2 possa contribuir para os efeitos deletérios relacionados à atividade do SRA no envelhecimento. A ECA desempenha papel importante no fenótipo hemodinâmico, mas sua inibição não altera significativamente o perfil autonômico de camundongos ELA-2 KO idosos.

REFERENCIAS

REFERÊNCIAS

1. BADER, M.; GANTEN, D. Update on tissue renin-angiotensin systems. **Journal of Molecular Medicine (Berlin, Germany)**, v. 86, n. 6, p. 615–621, 2008.
2. BECARI, C. et al. Role of Elastase-2 as an Angiotensin li-forming Enzyme in Rat Carotid Artery. **Journal of Cardiovascular Pharmacology**, v. 46, n. 4, p. 498–504, 1 out. 2005.
3. BECARI, C. et al. Elastase-2, a Tissue Alternative Pathway for Angiotensin II Generation, Plays a Role in Circulatory Sympathovagal Balance in Mice. **Frontiers in physiology**, v. 8, p. 170, 2017.
4. BECARI, C.; OLIVEIRA, E. B.; SALGADO, M. C. O. Alternative pathways for angiotensin II generation in the cardiovascular system. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 44, n. 9, p. 914–919, set. 2011.
5. BENIGNI, A. et al. Disruption of the Ang II type 1 receptor promotes longevity in mice. **The Journal of clinical investigation**, v. 119, n. 3, p. 524–30, mar. 2009.
6. BRASCH, H.; SIEROSLAWSKI, L.; DOMINIAK, P. Angiotensin II increases norepinephrine release from atria by acting on angiotensin subtype 1 receptors. **Hypertension (Dallas, Tex. : 1979)**, v. 22, n. 5, p. 699–704, nov. 1993.
7. BURNISTON, J. G. et al. Angiotensin II induces apoptosis in vivo in skeletal, as well as cardiac, muscle of the rat. **Experimental Physiology**, v. 90, n. 5, p. 755–761, set. 2005.
8. CAMPBELL, D. J. Neprilysin Inhibitors and Bradykinin. **Frontiers in medicine**, v. 5, p. 257, 2018.
9. CASE, D. B. et al. Use of first-dose response or plasma renin activity to predict the long-term effect of captopril: identification of triphasic pattern of blood pressure response. **Journal of cardiovascular pharmacology**, v. 2, n. 4, p. 339–46, 1980.
10. COHN, J. N.; TOGNONI, G.; VALSARTAN HEART FAILURE TRIAL INVESTIGATORS. A randomized trial of the angiotensin-receptor blocker valsartan in chronic heart failure. **The New England Journal of Medicine**, v. 345, n. 23, p. 1667–1675, dez. 2001.
11. CORBETT, E. K. A. et al. Age-related loss of cardiac vagal preganglionic neurones in spontaneously hypertensive rats. **Experimental Physiology**, v. 92, n. 6, p. 1005–1013, 1 nov. 2007.
12. CROWLEY, S. D. et al. Distinct roles for the kidney and systemic tissues in blood pressure regulation by the renin-angiotensin system. **The Journal of clinical investigation**, v. 115, n. 4, p. 1092–9, abr. 2005.

13. DI RIENZO, M. et al. Baroreflex effectiveness index: an additional measure of baroreflex control of heart rate in daily life. **American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, v. 280, n. 3, p. R744–R751, mar. 2001.
14. DIAS DA SILVA, V. J. et al. Effects of long-term angiotensin converting enzyme inhibition on cardiovascular variability in aging rats. **Autonomic Neuroscience**, v. 124, n. 1–2, p. 49–55, 30 jan. 2006.
15. DINH, D. T. et al. Angiotensin receptors: distribution, signalling and function. **Clinical science (London, England : 1979)**, v. 100, n. 5, p. 481–92, 1 maio 2001.
16. DÜSING, R. et al. Baroreflex setting and sensitivity in normal subjects: Effects of pharmacologic inhibition of the angiotensin I converting enzyme. **The American Journal of Cardiology**, v. 59, n. 10, p. D50–D54, 24 abr. 1987.
17. DÜSING, R. Mega clinical trials which have shaped the RAS intervention clinical practice. **Therapeutic advances in cardiovascular disease**, v. 10, n. 3, p. 133–50, jun. 2016.
18. DZAU, V. J. et al. Pathophysiologic and therapeutic importance of tissue ACE: a consensus report. **Cardiovascular drugs and therapy**, v. 16, n. 2, p. 149–60, mar. 2002.
19. DZAU, V. J.; BURT, D. W.; PRATT, R. E. Molecular biology of the renin-angiotensin system. **The American Journal of Physiology**, v. 255, n. 4 Pt 2, p. F563–573, out. 1988.
20. EDMOND DE MEERSMAN, R. et al. Vagal modulation and aging. 2006.
21. FARQUHARSON, C. A. .; STRUTHERS, A. D. Gradual reactivation over time of vascular tissue angiotensin I to angiotensin II conversion during chronic lisinopril therapy in chronic heart failure. **Journal of the American College of Cardiology**, v. 39, n. 5, p. 767–775, 6 mar. 2002.
22. FATEEV, M. M. et al. Heart rate variability in conscious and anesthetized rats under the action of angiotensin converting enzyme inhibitors. **Bulletin of experimental biology and medicine**, v. 152, n. 5, p. 590–4, mar. 2012.
23. FREELING, J. L.; LI, Y. Age-related attenuation of parasympathetic control of the heart in mice. **International journal of physiology, pathophysiology and pharmacology**, v. 7, n. 3, p. 126–35, 2015.
24. FYHRQUIST, F.; SAIJONMAA, O. Renin-angiotensin system revisited. **Journal of Internal Medicine**, v. 264, n. 3, p. 224–236, 1 set. 2008.
25. GIUDICELLI, J. F. et al. The effect of enalapril on baroreceptor mediated reflex function in normotensive subjects. **British journal of clinical pharmacology**, v. 20, n. 3, p. 211–8, set. 1985.

26. GIVEN, B. D. et al. Duration of action and short-term hormonal responses to enalapril (MK 421) in normal subjects. **Journal of cardiovascular pharmacology**, v. 6, n. 3, p. 436–41, 1984.
27. GRIBBIN, B. et al. Effect of age and high blood pressure on baroreflex sensitivity in man. **Circulation research**, v. 29, n. 4, p. 424–31, out. 1971.
28. GRICHOIS, M. L. et al. Differential effects of enalapril and hydralazine on short-term variability of blood pressure and heart rate in rats. **Journal of cardiovascular pharmacology**, v. 19, n. 6, p. 863–9, jun. 1992.
29. HERICHOVA, I.; SZANTOOVA, K. Renin-angiotensin system: upgrade of recent knowledge and perspectives. **Endocrine regulations**, v. 47, n. 1, p. 39–52, jan. 2013.
30. IBSEN, H. et al. Reflex-hemodynamic adjustments and baroreflex sensitivity during converting enzyme inhibition with MK-421 in normal humans. **Hypertension (Dallas, Tex. : 1979)**, v. 5, n. 2 Pt 2, p. 1184-91, 1983.
31. ICHIKAWA, M. et al. Differential modulation of baroreceptor sensitivity by long-term antihypertensive treatment. **Hypertension (Dallas, Tex. : 1979)**, v. 26, n. 3, p. 425–31, set. 1995.
32. JORDE, U. P. et al. Maximally recommended doses of angiotensin-converting enzyme (ACE) inhibitors do not completely prevent ACE-mediated formation of angiotensin II in chronic heart failure. **Circulation**, v. 101, n. 8, p. 844–6, 29 fev. 2000.
33. KOBAYASHI, M.; FURUKAWA, Y.; CHIBA, S. Positive chronotropic and inotropic effects of angiotension II in the dog heart. **European Journal of Pharmacology**, v. 50, n. 1, p. 17–25, 1 jul. 1978.
34. LAGE, S. G. et al. Relationship of arterial compliance to baroreflex function in hypertensive patients. **The American journal of physiology**, v. 265, n. 1 Pt 2, p. H232-7, jul. 1993.
35. LAITINEN, T. et al. Age and gender dependency of baroreflex sensitivity in healthy subjects. **Journal of Applied Physiology**, v. 84, n. 2, p. 576–583, fev. 1998.
36. LAITINEN, T. et al. Age dependency of cardiovascular autonomic responses to head-up tilt in healthy subjects. **Journal of Applied Physiology**, v. 96, n. 6, p. 2333–2340, jun. 2004.
37. LAVOIE, J. L.; SIGMUND, C. D. Minireview: Overview of the Renin-Angiotensin System—An Endocrine and Paracrine System. **Endocrinology**, v. 144, n. 6, p. 2179–2183, 1 jun. 2003.
38. LUND-JOHANSEN, P.; OMVIK, P. Long-term haemodynamic effects of enalapril (alone and in combination with hydrochlorothiazide) at rest and during exercise in essential hypertension. **Journal of hypertension. Supplement : official journal of the International Society of Hypertension**, v. 2, n. 2, p. S49-56, dez. 1984.

39. MCKINLEY, M. J. et al. The brain renin–angiotensin system: location and physiological roles. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 35, n. 6, p. 901–918, 1 jun. 2003.
40. MEHTA, P. K.; GRIENDLING, K. K. Angiotensin II cell signaling: physiological and pathological effects in the cardiovascular system. **American Journal of Physiology-Cell Physiology**, v. 292, n. 1, p. C82–C97, jan. 2007.
41. MONAHAN, K. D. et al. Age-associated changes in cardiovascular baroreflex sensitivity are related to central arterial compliance. **American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology**, v. 281, n. 1, p. H284–H289, jul. 2001.
42. MONTANO, N. et al. Effect of captopril on sympathetic preganglionic efferent activity in cats. **American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology**, v. 264, n. 2, p. H345–H351, fev. 1993.
43. MORAVEC, C. S. et al. Inotropic effects of angiotensin II on human cardiac muscle in vitro. **Circulation**, v. 82, n. 6, p. 1973–1984, dez. 1990.
44. MOZAFFARIAN, D. et al. Executive Summary: Heart Disease and Stroke Statistics—2016 Update. **Circulation**, v. 133, n. 4, p. 447–454, 26 jan. 2016.
45. PAUL, M.; POYAN MEHR, A.; KREUTZ, R. Physiology of Local Renin-Angiotensin Systems. **Physiological Reviews**, v. 86, n. 3, p. 747–803, jul. 2006.
46. PAULA, C. A. et al. Purification and substrate specificity of an angiotensin converting elastase-2 from the rat mesenteric arterial bed perfusate. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure and Molecular Enzymology**, v. 1388, n. 1, p. 227–238, 14 out. 1998.
47. PONCHON, P.; ELGHOZI, J. L. Contribution of the renin-angiotensin and kallikrein-kinin systems to short-term variability of blood pressure in two-kidney, one-clip hypertensive rats. **European Journal of Pharmacology**, v. 297, n. 1–2, p. 61–70, 15 fev. 1996.
48. POOL, J. L. et al. Controlled multicenter study of the antihypertensive effects of lisinopril, hydrochlorothiazide, and lisinopril plus hydrochlorothiazide in the treatment of 394 patients with mild to moderate essential hypertension. **Journal of cardiovascular pharmacology**, v. 9 Suppl 3, p. S36-42, 1987.
49. PORTA, A. et al. Entropy, entropy rate, and pattern classification as tools to typify complexity in short heart period variability series. **IEEE Transactions on Biomedical Engineering**, v. 48, n. 11, p. 1282–1291, 2001.
50. PORTA, A. et al. Assessment of cardiac autonomic modulation during graded head-up tilt by symbolic analysis of heart rate variability. **American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology**, v. 293, n. 1, p. H702–H708, jul. 2007.
51. RIALS, S. J. et al. Regression of LV hypertrophy with captopril normalizes membrane currents in rabbits. **American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology**, v. 275, n. 4, p. H1216–H1224, out. 1998.

52. SANTOS, C. F. et al. Kinetic characterization and inhibition of the rat MAB elastase-2, an angiotensin I-converting serine protease. **Canadian journal of physiology and pharmacology**, v. 80, n. 1, p. 42–7, jan. 2002.
53. SANTOS, C. F. et al. Functional role, cellular source, and tissue distribution of rat elastase-2, an angiotensin II-forming enzyme. **American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology**, v. 285, n. 2, p. H775–H783, ago. 2003a.
54. SANTOS, R. A. S. et al. Angiotensin-(1-7) is an endogenous ligand for the G protein-coupled receptor Mas. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 100, n. 14, p. 8258–63, 8 jul. 2003b.
55. SCHLÜTER, K.-D.; WENZEL, S. Angiotensin II: a hormone involved in and contributing to pro-hypertrophic cardiac networks and target of anti-hypertrophic cross-talks. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 119, n. 3, p. 311–325, set. 2008.
56. SILVA, L. E. V. et al. Comparison between spectral analysis and symbolic dynamics for heart rate variability analysis in the rat. **Scientific reports**, v. 7, n. 1, p. 8428, 16 ago. 2017.
57. TAKAI, S. et al. Purification and characterization of angiotensin II-generating chymase from hamster cheek pouch. **Life Sciences**, v. 58, n. 7, p. 591–597, 12 jan. 1996.
58. TASK FORCE OF THE EUROPEAN SOCIETY OF CARDIOLOGY AND THE NORTH AMERICAN SOCIETY OF PACING AND ELECTROPHYSIOLOGY. Heart rate variability: standards of measurement, physiological interpretation and clinical use. **Circulation**, v. 93, n. 5, p. 1043–65, 1 mar. 1996.
59. TOBALDINI, E. et al. Symbolic analysis detects alterations of cardiac autonomic modulation in congestive heart failure rats. **Autonomic neuroscience: basic & clinical**, v. 150, n. 1–2, p. 21–6, 5 out. 2009.
60. TODD, P. A.; HEEL, R. C. Enalapril. A review of its pharmacodynamic and pharmacokinetic properties, and therapeutic use in hypertension and congestive heart failure. **Drugs**, v. 31, n. 3, p. 198–248, mar. 1986.
61. URATA, H. et al. Identification of a highly specific chymase as the major angiotensin II-forming enzyme in the human heart. **The Journal of biological chemistry**, v. 265, n. 36, p. 22348–57, 25 dez. 1990.
62. VARAGIC, J. et al. AT₁ receptor antagonism attenuates target organ effects of salt excess in SHR without affecting pressure. **American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology**, v. 294, n. 2, p. H853–H858, fev. 2008.
63. VETERANS ADMINISTRATION, C.-O. S. G. ON A. A. Racial differences in response to low-dose captopril are abolished by the addition of hydrochlorothiazide. **British journal of clinical pharmacology**, v. 14 Suppl 2, n. Suppl 2, p. 97S–101S, 1982.

64. VIDT, D. G. et al. Medical intelligence drug therapy: captopril. **The New England journal of medicine**, v. 306, n. 4, p. 214–9, 28 jan. 1982.
65. WAEBER, B. et al. Discrepancy between antihypertensive effect and angiotensin converting enzyme inhibition by captopril. **Hypertension (Dallas, Tex. : 1979)**, v. 2, n. 2, p. 236–42, 1980.
66. WAEBER, B. et al. Prediction of sustained antihypertensive efficacy of chronic captopril therapy: Relationships to immediate blood pressure response and control plasma renin activity. **American Heart Journal**, v. 103, n. 3, p. 384–390, 1 mar. 1982.
67. WILLIAMS, B. R.; KIM, J. Cardiovascular Drug Therapy in the Elderly: Theoretical and Practical Considerations. **Drugs & Aging**, v. 20, n. 6, p. 445–463, 2003.
68. ZHANG, Y. et al. Angiotensin-(1-7)-mediated Mas1 receptor/NF- κ B-p65 signaling is involved in a cigarette smoke-induced chronic obstructive pulmonary disease mouse model. **Environmental Toxicology**, v. 33, n. 1, p. 5–15, jan. 2018.