

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO  
ESCOLA DE EDUCAÇÃO FÍSICA E ESPORTE

CARACTERIZAÇÃO DA PARTICIPAÇÃO DO SISTEMA RENINA-ANGIOTENSINA  
NA CARDIOMIOPATIA INDUZIDA POR HIPERATIVIDADE SIMPÁTICA

Julio Cesar Batista Ferreira

SÃO PAULO  
2006

## LISTA DE SIGLAS, ABREVIACOES E SÍMBOLOS

$\alpha$	Alfa
$\beta$	Beta
AMPc	Adenosina monofosfato cíclico
Ang	Angiotensina
ANOVA	Análise de variância
AT	Receptor de angiotensina II
CO	Controle
COBEA	Colégio brasileiro de experimentação animal
DDiaVE	Diâmetro diastólico do ventrículo esquerdo
DNA	cido desoxirribonucléico
DSisVE	Diâmetro sistólico do ventrículo esquerdo
ECA	Enzima conversora de angiotensina
FE	Fração de ejeção
FS	Fração de encurtamento
GDP	Guanosina difosfato
GTP	Guanosina trifosfato
IP	Fosfato de inositol
KO	Nocaute
MAPK	Proteína quinase ativada por agentes mitognicos
Mg	miligrama
min	minuto
ml	mililitro
Modo M	Modo monodimensional
NA	Noradrenalina
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PKA	Proteína quinase A
PPDia	Espessura da parede posterior na diástole
PPSis	Espessura da parede posterior na sístole
Proteína G	Proteína da membrana ligada à GTP

RNA	Ácido ribonucléico
RT	Transcriptase reversa
SERCA	Bomba de cálcio do retículo sarcoplasmático
SIVDia	Espessura do septo intraventricular na diástole
SIVSis	Espessura do septo intraventricular na sístole
SNS	Sistema nervoso simpático
SRA	Sistema renina angiotensina
TBS	Salina tris-tamponada
uF	Unidade de fluorescência
VD	Ventrículo direito
VE	Ventrículo esquerdo

## LISTA DE TABELAS

	Página
TABELA 1 - Amostra utilizada e distribuição entre os grupos controle (CO) e com deleção dos receptores $\alpha_{2A}/\alpha_{2C}$ adrenérgicos (KO).....	34
TABELA 2 - Freqüência cardíaca (FC) durante exame ecocardiográfico, diâmetro diastólico final do ventrículo esquerdo (DDiaVE), diâmetro sistólico final do ventrículo esquerdo (DSisVE), espessura do septo intraventricular na diástole (SIVDia), espessura do septo intraventricular na sístole (SIVSis), espessura da parede posterior do ventrículo esquerdo na diástole (PPVEDia), espessura da parede posterior do ventrículo esquerdo na sístole (PPVESis) e massa do ventrículo esquerdo (MVE) em camundongos controle (CO) e com deleção dos receptores $\alpha_{2A}/\alpha_{2C}$ adrenérgicos (KO) aos três e sete meses de idade.....	41
TABELA 3 - Peso das câmaras cardíacas corrigido pelo peso corporal dos camundongos controle (CO) e com deleção dos receptores $\alpha_{2A}/\alpha_{2C}$ adrenérgicos (KO) aos três e sete meses de idade.....	47

## LISTA DE FIGURAS

	Página
FIGURA 1 - Taxa de sobrevivência em camundongos controle (CO) e com deleção dos receptores $\alpha_{2A}/\alpha_{2C}$ adrenérgicos (KO) ao longo de 12 meses.....	17
FIGURA 2 - Análise ecocardiográfica em modo monodimensional realizada em camundongos.....	23
FIGURA 3 - Imunomarcção para Ang II em cortes histológicos do ventrículo esquerdo de camundongos.....	29
FIGURA 4 - Distância total percorrida no teste de esforço físico máximo em camundongos controle (CO) e com deleção dos receptores $\alpha_{2A}/\alpha_{2C}$ adrenérgicos (KO) aos três e sete meses de idade.....	35
FIGURA 5 - Comportamento da pressão arterial dos camundongos controle (CO) e com deleção dos receptores $\alpha_{2A}/\alpha_{2C}$ adrenérgicos (KO) aos três e sete meses de idade.....	36
FIGURA 6 - Comportamento da frequência cardíaca em camundongos controle (CO) e com deleção dos receptores $\alpha_{2A}/\alpha_{2C}$ adrenérgicos (KO) aos três e sete meses de idade.....	37
FIGURA 7 - Fração de encurtamento (A) e fração de ejeção (B) dos camundongos controle (CO) e com deleção dos receptores $\alpha_{2A}/\alpha_{2C}$ adrenérgicos (KO) aos três e sete meses de idade.....	39
FIGURA 8 - Peso corporal (A) e peso da gordura retroperitoneal corrigida pelo peso corporal (B) de camundongos controle (CO) e com deleção dos receptores $\alpha_{2A}/\alpha_{2C}$ adrenérgicos (KO) aos três e sete meses de idade.....	43
FIGURA 9 - Peso dos pulmões corrigido pelo peso corporal (A) e razão do peso úmido/seco dos pulmões dos camundongos controle (CO)	

	e com deleção dos receptores $\alpha_{2A}/\alpha_{2C}$ adrenérgicos (KO) aos três e sete meses de idade.....	45
FIGURA 10 -	Peso dos rins corrigido pelo peso corporal dos camundongos controle (CO) e com deleção dos receptores $\alpha_{2A}/\alpha_{2C}$ adrenérgicos (KO) aos três e sete meses de idade.....	46
FIGURA 11 -	Diâmetro do cardiomiócito (A) e fração de colágeno cardíaco (B) de camundongos controle (CO) e com deleção dos receptores $\alpha_{2A}/\alpha_{2C}$ adrenérgicos (KO) aos três e sete meses de idade.....	49
FIGURA 12 -	Quantificação de células imunorreativas à Ang II no ventrículo esquerdo de camundongos controle (CO) e com deleção dos receptores $\alpha_{2A}/\alpha_{2C}$ adrenérgicos (KO) aos três e sete meses de idade.....	51
FIGURA 13 -	Atividade da enzima conversora de Angiotensina (ECA) no coração de camundongos controle (CO) e com deleção dos receptores $\alpha_{2A}/\alpha_{2C}$ adrenérgicos (KO) aos três e sete meses de idade.....	52
FIGURA 14 -	Atividade da enzima conversora de Angiotensina (ECA) nos rins de camundongos controle (CO) e com deleção dos receptores $\alpha_{2A}/\alpha_{2C}$ adrenérgicos (KO) aos três e sete meses de idade.....	53
FIGURA 15 -	Atividade da enzima conversora de Angiotensina (ECA) no soro de camundongos controle (CO) e com deleção dos receptores $\alpha_{2A}/\alpha_{2C}$ adrenérgicos (KO) aos três e sete meses de idade.....	54
FIGURA 16 -	Atividade da enzima conversora de Angiotensina (ECA) nos pulmões de camundongos controle (CO) e com deleção dos receptores $\alpha_{2A}/\alpha_{2C}$ adrenérgicos (KO) aos três e sete meses de idade.....	55
FIGURA 17 -	Atividade da renina plasmática em camundongos controle (CO) e com deleção dos receptores $\alpha_{2A}/\alpha_{2C}$ adrenérgicos (KO) aos três e sete meses de idade.....	57

- FIGURA 18 - Expressão protéica dos receptores de Angiotensina II, subtipos AT<sub>1</sub> e AT<sub>2</sub>, no coração de camundongos controle (CO) e com deleção dos receptores  $\alpha_{2A}/\alpha_{2C}$  adrenérgicos (KO) aos três e sete meses de idade..... 59
- FIGURA 19 - Expressão protéica da renina nos rins dos camundongos controle (CO) e com deleção dos receptores  $\alpha_{2A}/\alpha_{2C}$  adrenérgicos (KO) aos três e sete meses de idade..... 61
- FIGURA 20 - Expressão gênica do angiotensinogênio cardíaco (AGT) cardíaco normalizada pela ciclofilina em camundongos controle (CO) e com deleção dos receptores  $\alpha_{2A}/\alpha_{2C}$  adrenérgicos (KO) aos três e sete meses de idade..... 62
- FIGURA 21 - Concentrações de noradrenalina cardíaca (A) e plasmática (B) de camundongos controle (CO) e com deleção dos receptores  $\alpha_{2A}/\alpha_{2C}$  adrenérgicos (KO) aos três e sete meses de idade..... 64

## RESUMO

## CARACTERIZAÇÃO DA PARTICIPAÇÃO DO SISTEMA RENINA-ANGIOTENSINA NA CARDIOMIOPATIA INDUZIDA POR HIPERATIVIDADE SIMPÁTICA

Autor: JULIO CESAR BATISTA FERREIRA

Orientadora: PROF<sup>a</sup> .DR<sup>a</sup>. PATRICIA CHAKUR BRUM

Recentemente foi descrito que camundongos com ablação dos receptores  $\alpha_{2A}$  e  $\alpha_{2C}$ - adrenérgicos (KO) desenvolvem cardiomiopatia induzida por hiperatividade simpática. No presente trabalho caracterizamos o fenótipo desses camundongos aos três e sete meses de idade avaliando a tolerância ao esforço, a função ventricular e a ultraestrutura cardíaca. Além disso, estudamos o efeito da hiperatividade simpática sobre o sistema renina angiotensina (SRA) cardíaco avaliando a expressão de Ang II cardíaca, a atividade da enzima conversora de angiotensina (ECA), a atividade e expressão da renina e a expressão do angiotensinogênio cardíaco. Aos três meses de idade os camundongos KO apresentaram redução de 16% na fração de encurtamento e aumento do diâmetro dos cardiomiócitos em relação ao grupo controle (CO), caracterizando uma cardiomiopatia em estágio inicial. Concomitantemente, os animais KO apresentaram aumento da Ang II, atividade da ECA e expressão do angiotensinogênio cardíacos; e aumento da atividade da renina plasmática. Aos sete meses de idade, os camundongos KO apresentaram intolerância ao esforço, redução de 34% na fração de encurtamento, dilatação do ventrículo esquerdo, retenção hídrica nos pulmões, aumento do diâmetro dos cardiomiócitos e acúmulo de colágeno cardíaco em relação ao grupo CO, caracterizando uma cardiomiopatia grave com sinais clínicos de IC. Nessa fase, os camundongos KO apresentaram aumento da Ang II e expressão do angiotensinogênio cardíacos; e diminuição da expressão e atividade da renina. Dessa forma, os dados evidenciaram a ativação do SRA cardíaco na progressão da cardiomiopatia induzida por hiperatividade simpática.

Palavras-chave: insuficiência cardíaca, sistema nervoso simpático, sistema renina-angiotensina, camundongos geneticamente modificados.

## ABSTRACT

CHARACTERIZATION OF RENIN-ANGIOTENSIN SYSTEM IN CARDIOMYOPATHY  
INDUCED BY SYMPATHETIC HYPERACTIVITY

Author: JULIO CESAR BATISTA FERREIRA

Adviser: PROF<sup>a</sup> .DR<sup>a</sup>. PATRICIA CHAKUR BRUM

We have recently reported that disruption of both  $\alpha_{2A}$  and  $\alpha_{2C}$  adrenergic receptor subtypes (KO) in mice leads to sympathetic hyperactivity with evidence of heart failure (HF) by seven months (mo) of age. In the present study, we have performed the phenotypical characterization on KO mice at three and seven month of age. In addition, we evaluated the effect of sympathetic hyperactivity on cardiac renin-angiotensin system (RAS) components. For that, we evaluated cardiac Ang II content, angiotensin converting activity (ACE), plasma renin activity and cardiac angiotensinogen expression. At three mo, KO mice displayed reduced fractional shortening (16%) and increased cardiomyocyte width compared with age-matched wild type (WT). Indeed, KO mice showed significantly increased cardiac Ang II content, cardiac ACE activity, angiotensinogen expression and plasma renin activity. At seven mo, KO mice displayed exercise intolerance, reduced fractional shortening (34%), cardiac dilatation, lung edema, increased cardiomyocyte width and increased cardiac collagen content compared with age-matched WT. In addition, KO mice presented an increased cardiac Ang II content and angiotensinogen expression, concomitantly with a decreased plasma renin activity. Collectively, these results uncover potential feedback regulation of cardiac and circulating components of SNS and RAS, which may contribute to a better understanding of the processes taking place during the progression of cardiomyopathy induced by sympathetic hyperactivity.

Keywords: heart failure, sympathetic nervous system, renin angiotensin system,  $\alpha_{2A}/\alpha_{2C}$  adrenergic knockout mice

## 1 INTRODUÇÃO

A síndrome da insuficiência cardíaca (IC) é consequência da incapacidade dos ventrículos em bombear quantidades adequadas de sangue para manter as necessidades periféricas do organismo (COLUCCI, 1998). Essa síndrome era descrita primariamente como um distúrbio hemodinâmico associado à diminuição do débito cardíaco com consequente baixo fluxo renal, levando à retenção de sódio, água e o surgimento de edemas periférico e pulmonar que acabavam por levar o paciente ao óbito. Atualmente, a IC tem sido vista como uma doença da circulação e não apenas do coração. Quando o débito cardíaco é reduzido após agressão miocárdica, mecanismos neuro-humorais são ativados com o objetivo de preservar a homeostase circulatória. Embora originalmente vista como uma resposta compensatória benéfica, a liberação endógena de neuro-hormônios vasoativos parece exercer papel deletério no desenvolvimento da IC, pelo aumento da sobrecarga de volume e da pós-carga do ventrículo com contratilidade já diminuída, levando à progressão da IC já existente. Esses neuro-hormônios podem exacerbar as anormalidades metabólicas já existentes, ocasionando o aparecimento de arritmias cardíacas. Por essa razão, a ativação neuro-humoral contribui de maneira significativa para os sintomas da síndrome, assim como para a alta mortalidade associada.

A ativação neuro-humoral observada na IC é caracterizada pela hiperatividade dos SNS e SRA dentre outros (YONEMOCHI, YASUNAGA, TESHIMA, IWAO, AKIYOSHI, NAKAGAWA, SAIKAWA & ITO, 1998). A hiperatividade do SNS é capaz de prevenir a queda do débito cardíaco durante as fases iniciais da IC, desencadeando respostas como o aumento da frequência cardíaca, contratilidade miocárdica e ativação do SRA. Porém a longo prazo, esta hiperatividade torna-se preditivo de mortalidade (BLUMENFELD, SEALEY, MANN, BRAGAT, MARION, PECKER, SOTELO, AUGUST, PICKERING & LARAGH, 1999). Já o aumento das concentrações de Ang II, dada pela hiperatividade do SRA, desencadeia uma série de alterações estruturais cardíacas observadas na progressão da IC. Essas alterações morfológicas estão associadas à degeneração dos miócitos cardíacos e

hipertrofia dos miócitos remanescentes, além da proliferação de fibroblastos (PENG, CARRETERO, VULJAJ, LIAO, MOTIVALA, PETERSON & RHALEB, 2005; POKHAREL, SHARMA & PINTO, 2003). Discorreremos a seguir em maior detalhe sobre os efeitos da hiperatividade desses sistemas no desenvolvimento da IC.

## **2 REVISÃO DE LITERATURA**

### **2.1 Insuficiência cardíaca**

A insuficiência cardíaca é a via final comum da maioria das cardiomiopatias e representa importante problema de saúde pública, considerando-se a prevalência crescente e os altos índices de hospitalização associados. Atualmente, estima-se que cerca de 4,6 milhões de pacientes nos Estados Unidos tenham IC, sendo 550 mil novos casos a cada ano<sup>1</sup>. No Brasil, segundo DATASUS<sup>2</sup>, do Ministério da Saúde, existem cerca de dois milhões de pacientes com IC e incidência de 240 mil novos casos ao ano. A mortalidade anual oscila em torno de 10% para pacientes nas diferentes classes de IC e de 30 a 40% para enfermos em classe funcional IV da *New York Heart Association* (BROWN, 1994).

A IC é uma síndrome clínica de alta incidência e mau prognóstico, caracterizada por alterações morfofuncionais cardíacas, fadiga, dispnéia e grande limitação aos esforços físicos, além da diminuição da expectativa de vida (BRUM, ROLIM, BACURAU & MEDEIROS, 2006). Apesar dos grandes avanços no entendimento e no tratamento da IC nos últimos anos, a mortalidade dos pacientes permanece elevada. Essa mortalidade é conseqüente à progressão da disfunção ventricular que culmina em choque cardiogênico ou, subitamente, em arritmias ventriculares graves (KATZ, 2003).

<sup>1</sup> Fonte: *American Heart Association*. Dados disponíveis no site [www.americanheart.org](http://www.americanheart.org)

<sup>2</sup> Fonte: MS/Funasa/Cenepi-Sistema de Informações sobre Mortalidade (SIM). Dados disponíveis no site do DATA-SUS: <http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/sim/obtm.htm>

Na fase inicial da disfunção ventricular, a ativação do sistema nervoso simpático, assim como níveis plasmáticos elevados de renina, noradrenalina, peptídeo natriurético atrial e vasopressina (FLORAS, 1993), representam importantes mecanismos compensatórios para a manutenção do débito cardíaco (GAFFNEY, CHIDSEY & BRAUNWALD, 1963) e da pressão arterial (FERGUSON, ABOUD & MARK, 1984). No entanto, exposições crônicas às catecolaminas liberadas pelos terminais nervosos simpáticos e concentrações elevadas de Ang II levam a um aumento contínuo da atividade neuro-humoral que contribui para o dano no tecido miocárdico e deterioração da função cardíaca (CICOGNA & OKOSHI, 2000; STEIN, KARAGOUNIS, ANDERSON, KLIGFIELD & LERMAN, 1995).

## **2.2 Participação do sistema nervoso simpático e sistema renina angiotensina na insuficiência cardíaca**

### **2.2.1 Atuação do sistema nervoso simpático na insuficiência cardíaca**

Hoje em dia a descrição da hiperatividade do SNS na IC é clássica. O nível plasmático de noradrenalina reflete a atividade do SNS (PACKER, 1988) e está bastante elevado em portadores de IC, em proporção à gravidade clínica da doença. É importante ressaltar que essa hiperatividade do SNS precede e prediz o desenvolvimento da IC, mesmo em pacientes com disfunção ventricular assintomática (PACKER, 1988).

Vários estudos têm demonstrado o valor prognóstico da concentração plasmática da noradrenalina (BRUM, KOSEK, PATTERSON, BERNSTEIN & KOBILKA, 2002; DAVIES, WITHAM & STRUTHERS, 2005; STEIN et al., 1995). No estudo de COHN, LEVINE, OLIVARI, GARBERG, LURA, FRANCIS, SIMON e RECTOR (1984) pacientes com concentrações elevadas de noradrenalina apresentavam menor taxa de sobrevida em 24 meses. Em especial, aqueles que possuíam concentrações acima de 800 ng/ml apresentavam sobrevida inferior a 20% no período. Mais recentemente, ROVEDA, MIDDLEKAUFF, RONDON, REIS, SOUZA, NASTARI, BARRETTO, KRIEGER e NEGRAO (2003) por meio de medida

direta da atividade nervosa simpática em pacientes com IC, demonstraram uma relação direta entre a atividade nervosa do nervo fibular e a gravidade da doença, ou seja, quanto maior o comprometimento clínico maior a atividade nervosa simpática.

A hiperatividade do SNS não é apenas um marcador prognóstico que contribui para a piora clínica e hemodinâmica da IC. Estudos multicêntricos têm demonstrado melhora nos parâmetros hemodinâmicos e principalmente redução da mortalidade em portadores de IC que fazem uso de bloqueadores  $\beta$ -adrenérgicos (JANOSI, GHALI, HERLITZ, CZURIGA, KLIBANER, WIKSTRAND & HJALMARSON, 2003).

Dentre os mecanismos celulares envolvidos na deterioração da função cardíaca na hiperatividade nervosa simpática está a hiperestimulação dos receptores  $\beta$ -adrenérgicos. O cardiomiócito expressa três diferentes isoformas de receptores  $\beta$ -adrenérgicos, as isoformas  $\beta_1$ ,  $\beta_2$  e  $\beta_3$ . As isoformas  $\beta_1$  e  $\beta_2$  estão expressas em corações sadios na proporção de 70:30 e quando ativadas, promovem taquicardia e aumento da contratilidade miocárdica (WALLUKAT, 2002). Já a isoforma  $\beta_3$  apresenta baixa expressão cardíaca, não influenciando na razão dos receptores  $\beta_1$ ,  $\beta_2$  cardíacos. Os receptores  $\beta_3$  cardíacos parecem mediar efeitos inotrópicos negativos no cardiomiócito (DEVIC, XIANG, GOULD & KOBILKA, 2001). Os receptores  $\beta$ -adrenérgicos pertencem à família de receptores acoplados à proteína G com sete domínios transmembrânicos. A ativação destes receptores por agonistas específicos catalisa a troca de GDP (guanosina difosfato) por GTP (guanosina trifosfato) na subunidade  $G\alpha$  da proteína G e resulta na dissociação do heterodímero em subunidades  $G\alpha$  e  $G\beta\gamma$ . A subunidade  $G\alpha$  transloca-se do complexo da proteína G para a enzima adenilatociclase e estimula a hidrólise de ATP e formação do segundo mensageiro AMPc. O aumento das concentrações de AMPc intracelular é capaz de ativar a holoenzima proteína quinase A (PKA) na subunidade regulatória, liberando a subunidade catalítica para o citosol. Ativada pelos receptores  $\beta$ -adrenérgicos acoplados à proteína  $G_s$ , a PKA é capaz de regular a contratilidade do cardiomiócito fosforilando proteínas chave como: a) canais de cálcio do tipo L e receptores de rianodina, ambos levando ao aumento da entrada de cálcio para o

citossol (GERHARDSTEIN, PURI, CHIEN & HOSEY, 1999; ZHAO, GUTIERREZ, CHANG & HOSEY, 1994); b) fosfolamban, um modulador da bomba de cálcio dependente de ATP associada ao retículo sarcoplasmático (SERCA), acelerando a velocidade de relaxamento cardíaco devido à maior recaptação de cálcio pelo retículo sarcoplasmático (SIMMERMAN & JONES, 1998); e c) troponina I, reduzindo a sensibilidade do miofilamento ao cálcio (SULAKHE & VO, 1995). Além disso, a PKA fosforila receptores  $\beta$ -adrenérgicos, resultando em desacoplamento parcial e dessensibilização do receptor frente ativação agonista crônica (BRUM et al., 2006).

Os receptores  $\beta$ -adrenérgicos apresentam respostas celulares que são proteína G-dependente. O efeito cronotrópico positivo desencadeado pela ativação do receptor  $\beta_1$ -adrenérgico no cardiomiócito é mediado via proteína G estimulatória ( $G_s$ ). Recentemente, Martin et al. propuseram que o receptor  $\beta_1$ -adrenérgico pode desacoplar-se da proteína  $G_s$  e acoplar-se à proteína G inibitória ( $G_i$ ) (MARTIN, WHALEN, ZAMAH, PIERCE & LEFKOWITZ, 2004). Entretanto, o efeito celular desta troca na resposta celular ainda não está esclarecido. Em contrapartida, o receptor  $\beta_2$ -adrenérgico pode acoplar-se às proteínas  $G_s$  e  $G_i$  dos cardiomiócitos. O acoplamento do receptor  $\beta_2$ -adrenérgico à proteína  $G_i$  está relacionado à ativação de vias anti-apoptóticas no cardiomiócito (ZHU, ZHENG, KOCH, LEFKOWITZ, KOBILKA & XIAO, 2001).

Dentre os mecanismos celulares envolvidos na deterioração da função cardíaca na hiperatividade do SNS estão a diminuição da expressão dos receptores  $\beta_1$ -adrenérgicos, processo conhecido como *downregulation* do receptor, e dessensibilização dos receptores  $\beta_2$ -adrenérgicos cardíacos (BRISTOW, 1993). Os receptores  $\beta_1$  e  $\beta_2$  adrenérgicos passam a expressar-se no cardiomiócito na proporção de 50:50 (WALLUKAT, PODLOWSKI, NISSEN, MORWINSKI, CSONKA, TOSAKI & BLASIG, 2003). Além das alterações observadas na expressão e função dos receptores  $\beta$ -adrenérgicos, observa-se alteração na expressão da proteína G em portadores de IC. A razão entre  $G_{\alpha s}/G_{\alpha i}$  está reduzida o suficiente para causar desacoplamento do receptor de superfície da adenilatociclase, de modo que a noradrenalina liberada pelos terminais nervosos simpáticos liga-se ao seu receptor,

porém não resulta em aumento no teor intracelular de AMPc (KOUCHI, ZOLK, JOCKENHOVEL, ITTER, LINZ, CREMERS & BOHM, 2000). Esta resposta afeta o balanço entre os efeitos excitatórios e inibitórios sobre a adenilato ciclase e podem contribuir para a diminuição na atividade desta enzima e, conseqüentemente, causar um prejuízo na resposta inotrópica em corações de portadores de IC. Por fim, a hiperatividade simpática observada na progressão da IC exerce efeito tóxico direto sobre os cardiomiócitos, promovendo diminuição da contratilidade miocárdica e desbalanço eletrolítico desencadeado pela alteração das concentrações de cálcio intracelular, levando então ao aumento no consumo de oxigênio pelo miocárdio, freqüência e gravidade de arritmias cardíacas (XIANG & KOBILKA, 2003).

### 2.2.2 Sistema renina – angiotensina

O sistema renina-angiotensina corresponde a um complexo sistema endócrino, parácrino, autócrino e intácrino que exerce importante papel no controle da manutenção da homeostasia cardiovascular e renal (PAUL, POYAN MEHR & KREUTZ, 2006). Previamente definido como um sistema endócrino, tem a cascata bioquímica iniciada com a liberação da renina pelas células justaglomerulares renais. A renina tem especificidade muito grande pelo seu substrato, o angiotensinogênio, sintetizado principalmente no fígado. Uma vez secretado, o substrato é clivado pela renina na circulação, formando o decapeptídeo angiotensina I (Ang I). Posteriormente, sob ação de enzimas específicas como enzima conversora de angiotensina, catepsinas e quimases a Ang I é convertida ao octapeptídeo Ang II, substância ativa responsável pelos principais efeitos fisiológicos associados ao SRA, atuando diretamente nos receptores de Ang II, subtipos AT<sub>1</sub> e AT<sub>2</sub> (SIRAGY, 1999). Dentre as diversas funções desempenhadas pela Ang II, destacam-se a regulação da homeostasia de fluidos, eletrólitos, síntese e liberação de aldosterona, vasoconstrição, estimulação da liberação de prostaglandinas, angiogênese, remodelamento do ventrículo esquerdo, controle do SNS e modulação da densidade de receptores de bradicinina e insulina (GOODMAN & GILMAN, 2003).

Esta visão clássica do SRA endócrino, observada durante décadas, foi revisitada nos últimos anos baseada em achados que contribuíram para maior complexidade do SRA. Diferentes receptores de Ang II (AT<sub>1</sub>, AT<sub>2</sub> e AT<sub>4</sub>) e vias de sinalização intracelular envolvidas na transdução do sinal foram caracterizados (DE GASPARO, CATT, INAGAMI, WRIGHT & UNGER, 2000; IWAI & INAGAMI, 1992; NOUET & NAHMIAS, 2000). Além disso, novos polipeptídeos originados do SRA, como por exemplo, a Ang 1-7, e vias alternativas de formação de Ang II, como por exemplo, a via da serina protease quimase foram identificados (LOOT, ROKS, HENNING, TIO, SUURMEIJER, BOOMSMA & VAN GILST, 2002; URATA, NISHIMURA & GANTEN, 1996). Entretanto, o principal achado que contribuiu para o novo entendimento do SRA foi a confirmação da existência de um SRA local ou tecidual. Esse conceito foi baseado na descoberta de componentes do SRA em diferentes tecidos, como por exemplo, glândulas adrenais, rins, coração, vasos e cérebro (GRIENDLING, MURPHY & ALEXANDER, 1993). Esses achados levantaram a nova hipótese da ação local do SRA baseada na síntese tecidual de Ang II.

Com a evolução das técnicas de DNA recombinante, os genes de todos os componentes do SRA conhecidos até o momento foram clonados e estudos de expressão gênica puderam avaliar a ativação e regulação destes genes em diferentes tecidos, demonstrando a possibilidade de síntese de Ang II local. Além disso, o desenvolvimento de animais que apresentavam ablação ou hiperexpressão local dos genes para os diferentes componentes do SRA foi extremamente importante no entendimento do SRA tecidual (BADER, PETERS, BALTATU, MULLER, LUFT & GANTEN, 2001; BALTATU & BADER, 2003; COLE, XIAO, ADAMS, DISHER, ZHAO & BERNSTEIN, 2003; LAKE-BRUSE & SIGMUND, 2000; LAVOIE, BIANCO, SAKAI, KEEN, RYAN & SIGMUND, 2004), sugerindo que sistemas locais podem operar completamente ou parcialmente independentes do circulante (CAMPBELL, 1987). A grande controvérsia do novo conceito de SRA local baseou-se na questão da síntese local dos componentes do SRA ou captação do circulante.

Uma série de trabalhos sugere a síntese intracelular de componentes do SRA no tecido cardíaco dada pela observação da expressão dos RNAs mensageiros do angiotensinogênio, renina e ECA nos átrios e ventrículos de roedores, cachorros e humanos (DZAU, ELLISON, BRODY, INGELFINGER & PRATT, 1987; DZAU & RE, 1987; HOKIMOTO, YASUE, FUJIMOTO, YAMAMOTO, NAKAO, KAIKITA, SAKATA & MIYAMOTO, 1996). CAMPBELL e HABENER (1986) foram os primeiros a detectar a presença de RNA mensageiro para o angiotensinogênio no tecido cardíaco. Em relação à renina, a expressão gênica desta peptidase no coração ainda é controversa. Alguns pesquisadores já constataram a presença de RNA mensageiro para a renina cardíaca pelas técnicas de *Northern blotting* (DZAU et al., 1987), ensaios de hibridização (PAUL, WAGNER, METZGER, GANTEN, LANG, SUZUKI, MURAKAMI, BURBACH & LUDWIG, 1988) e RT-PCR (PAUL, WAGNER & DZAU, 1993), entretanto, a expressão do RNA mensageiro nestes estudos foi extremamente baixa, e grandes quantidades de RNA mensageiro ou RNA total foram utilizadas para elevar o sinal da renina cardíaca em níveis que fossem detectáveis. VON LUTTEROTTI, CATANZARO, SEALEY e LARAGH (1994) criticaram estes resultados dizendo que os achados de RNA mensageiro para renina no tecido cardíaco foram resultados de contaminação do material e artefatos. Utilizando técnicas de DNA recombinante, YAN, CHEN, PITARRESI, SIGMUND, GROSS, SEALEY, LARAGH e CATANZARO (1998) não detectaram a expressão de renina cardíaca em camundongos transgênicos que carregavam o gene para a renina humana e utilizavam sua região promotora nativa. Já, Pinto et al. observaram que ratos transgênicos que carregavam o vetor construído com o gene renina-2 de camundongo e sua própria região promotora apresentavam aumento da expressão gênica da renina no coração, sugerindo que em algumas espécies o coração é um foco de produção de renina extra-renal (PINTO, BUIKEMA, VAN GILST, SCHOLTENS, VAN GEEL, DE GRAEFF, WAGNER & PAUL, 1997). DE MELLO e DANSER (2000) sugerem que a renina só é sintetizada no coração em situações patológicas como na IC.

Diferente das controvérsias relacionadas à expressão gênica de renina cardíaca, já está bem estabelecido na literatura que grande parte da renina presente no coração advém da captura da enzima circulante por difusão para o líquido intersticial (DE LANNOY, DANSER, VAN KATS, SCHOEMAKER, SAXENA & SCHALEKAMP, 1997) e por ligação da renina a receptores cardíacos específicos para renina e pró-renina cardíacos, como por exemplo, o receptor de manose seis fosfato (PETERS & CLAUSMEYER, 2002). SARIS, VAN DEN EIJNDEN, LAMERS, SAXENA, SCHALEKAMP e DANSER (2002) constataram que cardiomiócitos isolados de ratos neonatos em cultura desenvolveram hipertrofia apenas na presença de pró-renina e angiotensinogênio. NGUYEN, BURCKLE & SRAER, 2004; NGUYEN, DELARUE, BURCKLE, BOUZHIR, GILLER e SRAER (2002) descreveram que o coração apresenta elevada densidade de receptores de renina e pró-renina. Além disso, sugerem que estes receptores são capazes de ativar vias de sinalização intracelular, como a via das MAPKs (proteína quinase ativada por agentes mitogênicos), independente de Ang II. Conjuntamente, estes trabalhos sugerem que a renina cardíaca utilizada na clivagem do angiotensinogênio em Ang I é, em sua maior parte, captada da circulação e que os receptores de renina e pró-renina cardíacos exercem importante função na ativação de vias de sinalização intracelular.

Ao contrário da renina, a presença da ECA no coração já está bem caracterizada. A expressão do gene da ECA e a atividade desta enzima podem ser facilmente detectáveis por diferentes métodos em corações de roedores (HIRSCH, TALSNESS, SCHUNKERT, PAUL & DZAU, 1991; KREUTZ, FERNANDEZ-ALFONSO, LIU, GANTEN & PAUL, 1995; SCHUNKERT, DZAU, TANG, HIRSCH, APSTEIN & LORELL, 1990) e humanos (PAUL, WAGNER & DZAU, 1993). Uma outra peptidase capaz de converter Ang I em Ang II, denominada quimase, apresenta importante função na regulação local do SRA. URATA, HEALY, STEWART, BUMPUS e HUSAIN (1990) descreveram que 80% da formação de Ang II cardíaca em humanos era dependente da ação da quimase, enquanto a ECA cardíaca era responsável por 11%, sugerindo que a quimase exerceria importante função na via de formação de Ang II cardíaca em humanos. Diferente dos humanos, em roedores a

ECA é a principal enzima responsável pela formação de Ang II, uma vez que estes animais apresentam uma isoforma inativa de quimase (DOSTAL & BAKER, 1999).

Embora a Ang II seja reconhecidamente o principal peptídeo efetor do SRA, outras angiotensinas com importante papel fisiológico já foram descritas na literatura. SANTOS, CASTRO, GAVA, PINHEIRO, ALMEIDA, PAULA, CRUZ, RAMOS, ROSA, IRIGOYEN, BADER, ALENINA, KITTEN e FERREIRA (2006) sugerem que o heptapeptídeo Ang 1-7 exerce efeito antagônico aos efeitos observados pela Ang II no coração e vasos. Formada a partir da clivagem da Ang I pela PEP (prolil-endopeptidase) ou a partir da clivagem da Ang II pela ECA 2, a Ang 1-7 é capaz de ligar-se ao receptor Mas e promover vasodilatação e melhorar a função cardíaca em modelos experimentais de hipertensão e IC, respectivamente (BROSNIHAN, LI & FERRARIO, 1996; LOOT et al., 2002). Dessa forma, a descoberta de novos componentes do SRA sugere a existência de um SRA que desempenha funções dicotômicas.

### 2.2.3 Atuação do sistema renina - angiotensina na insuficiência cardíaca

A hiperativação do SRA presente em portadores de IC está extremamente relacionada à morbidade, mortalidade e intolerância à atividade física (DENDORFER, RAASCH, TEMPEL & DOMINIAK, 1998).

Durante a progressão e agravamento da IC, um dos principais fatores que estimulam a hiperatividade do SRA é a diminuição da perfusão renal. A queda da perfusão renal desencadeada pela diminuição do débito cardíaco na IC acarreta em hiperestimulação simpática e conseqüentemente, aumento da síntese de renina pelas células justaglomerulares renais, levando a maior formação de Ang II (GOODMAN & GILMAN, 2003). Este mecanismo de síntese de Ang II ocorre com o intuito de manter a pressão de perfusão tecidual adequada, o que é alcançada pelo seu efeito vasoconstritor. Entretanto, além de promover vasoconstrição, o SRA estimula o trocador  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  no túbulo proximal do néfron, promovendo aumento da reabsorção de  $\text{Na}^+$  e  $\text{Cl}^-$  (GOODMAN & GILMAN, 2003). Além disso, estimula a zona glomerulosa do córtex renal a sintetizar e secretar aldosterona, que potencializa a

reabsorção de  $\text{Na}^+$  pelos túbulos coletor e distal, concomitante a excreção de  $\text{K}^+$  e  $\text{H}^+$ . Portanto, a ativação do SRA na IC leva ao aumento da retenção líquida dado pela elevada reabsorção de  $\text{Na}^+$  e excreção de  $\text{K}^+$  renal, promovendo aumento do volume sanguíneo circulante, e conseqüentemente, aumento da sobrecarga ventricular na diástole. Conseqüentemente, o aumento do volume diastólico final acarreta em maior pressão diastólica final no ventrículo esquerdo levando a maior tensão na parede ventricular, segundo a Lei de Laplace<sup>3</sup>. Este aumento na tensão da parede ventricular é um dos principais estímulos mecânicos desencadeantes da hipertrofia cardíaca.

Além do controle sistêmico descrito acima, o SRA exerce ação direta e indireta no coração de cardiopatas durante a progressão da IC. A ação direta acontece no remodelamento ventricular esquerdo por meio da ativação de receptores de Ang II acoplados a proteína G (Gq) na membrana celular do cardiomiócito, mais especificamente receptores do subtipo  $\text{AT}_1$  (OMURA, YOSHIYAMA, MATSUMOTO, KUSUYAMA, ENOMOTO, NISHIYA, IZUMI, KIM, ICHIJO, MOTOJIMA, AKIOKA, IWAO, TAKEUCHI & YOSHIKAWA, 2005). O receptor de Ang II foi identificado em 1970 (LIN & GOODFRIEND, 1970), e posteriormente diferenciado por ligantes específicos em receptores de Ang II, subtipos  $\text{AT}_1$  e  $\text{AT}_2$  (DE GASPARO et al., 2000). Os receptores de Ang II parecem promover respostas antagônicas no cardiomiócito. Enquanto o receptor  $\text{AT}_1$  estimula a hipertrofia cardíaca e o aumento da contratilidade miocárdica em situações fisiológicas e patológicas, o receptor  $\text{AT}_2$  exerce ações celulares inibitórias às ações mediadas pelo  $\text{AT}_1$ , via proteína  $\text{G}_i$  e tirosina fosfatases (DE GASPARO et al., 2000). Além disso, os receptores  $\text{AT}_1$  sofrem rápida dessensibilização e internalização quando ativados por Ang II (DE GASPARO et al., 2000).

<sup>3</sup>Lei de Laplace: Lei elaborada por Pierre Simon Laplace (1749-1827) que estabelece a relação entre pressão e tensão em um corpo esférico. Assim  $T=PR/2e$ , onde T=tensão, P=pressão, R=raio, e=espessura da parede. A equação estabelece que quanto maior o raio, maior a tensão na parede requerida para resistir uma dada pressão interna do fluido.

A ativação do receptor  $AT_1$  na IC, decorrente da hiperativação do SRA, exerce importante papel na regulação da contratilidade miocárdica, remodelamento cardíaco e reprogramação gênica por meio da amplificação de diferentes vias de sinalização celular (DORN 2ND & FORCE, 2005). Quando ativado, o receptor de Ang II, subtipo  $AT_1$ , estimula a hidrólise do fosfatidilinositol 4,5-bifosfato ( $IP_2$ ) em inositol 1,4,5-trifosfato ( $IP_3$ ) e diacilglicerol (DAG). Esta hidrólise é mediada via enzima fosfolipase  $C_\beta$  acoplada à membrana celular. Quando formado, o  $IP_3$  é capaz de ligar-se aos receptores de  $IP_3$  presentes no retículo sarcoplasmático e regular a saída de cálcio do retículo sarcoplasmático para o citosol do cardiomiócito. O cálcio liberado no citosol exerce importante papel no processo de contração muscular e ativação de vias de sinalização intracelular como, por exemplo, via cálcio-calmodulina e vias de proteína quinase C (PKC) (DORN 2ND & FORCE, 2005). Dessa forma, via liberação de cálcio, o  $IP_3$  exerce importante papel no controle da função cardíaca e ativação de vias celulares do cardiomiócito. Diferente do  $IP_3$ , o DAG age diretamente no controle do trofismo cardíaco estimulando diretamente diferentes isoformas de PKCs (MALHOTRA, KANG, OPAWUMI, BELIZARE & MEGGS, 2001) e a via das MAPKs (DORN 2ND & FORCE, 2005). Dessa forma estes receptores, além dos receptores  $\alpha_1$  – adrenérgicos e receptores de endotelina acoplados à proteína  $G_{\alpha q}$ , são os principais responsáveis pelo desencadeamento da sinalização intracelular que estimula a ativação dos fatores de transcrição que acabam por promover hipertrofia do cardiomiócito e ativação da proliferação de fibroblastos.

Além da regulação direta do remodelamento cardíaco durante a progressão da IC, o SRA controla indiretamente a função e estrutura cardíaca por meio da regulação na liberação de NA pelos terminais nervosos simpáticos. A Ang II interagindo com os receptores de Ang II, subtipo  $AT_1$ , presentes na região pré-sináptica do neurônio facilita a síntese e liberação de NA pelos terminais nervosos dos neurônios simpáticos e medula adrenal (ESCHENHAGEN, MENDE, DIEDERICH, NOSE, SCHMITZ, SCHOLZ, SCHULTE AM ESCH, WARNHOLTZ & SCHAFER, 1992). Essa liberação de NA facilitada pela Ang II nos terminais nervosos ocorre pelos seguintes mecanismos: atraso da retificação dos canais de potássio

(SUMNERS, ZHU, GELBAND & POSNER, 1996), diminuição da probabilidade de abertura dos canais de potássio (WANG, SUMNERS, POSNER & GELBAND, 1997), facilitação da abertura dos canais de cálcio dependentes de voltagem (SUMNERS et al., 1996) e aumento da frequência de disparo do neurônio (WANG, GELBAND, SUMNERS & POSNER, 1997). Em relação ao controle da síntese de NA pelos receptores de Ang II, subtipo AT<sub>1</sub>, a mesma ocorre por meio da estimulação da região promotora dos genes transportadores de NA (TNA), tirosina hidroxilase (TH) e dopamina β-hidroxilase (DβH) via ativação das MAPKs (GELBAND, SUMNERS, LU & RAIZADA, 1997). Dessa forma, a hiperatividade do SRA observada na IC pode resultar em uma maior síntese e liberação de NA pelos terminais nervosos simpáticos, contribuindo então, para uma hiperatividade simpática (KAWAI, FAN, DONG, SIDDIQUI, YATANI, STEVENS & LIANG, 1999). Como descrito anteriormente, estas alterações são benéficas na fase inicial da IC, porém cronicamente são deletérias e contribuem para o ciclo vicioso da IC, onde os SNS e SRA se retroalimentam levando a uma exacerbação na atividade de ambos.

A utilização de inibidores da ECA e antagonistas dos receptores de Ang II, subtipo AT<sub>1</sub>, no tratamento da IC apresenta resultados extremamente satisfatórios na regressão da IC, sendo que uma das respostas encontradas é a diminuição da liberação de NA e adrenalina via neural e humoral, respectivamente (DENDORFER et al., 1998; GUAZZI, PALERMO, PONTONE, SUSINI & AGOSTONI, 1999). Dessa forma, o tratamento da IC com inibidores da ECA e antagonistas dos receptores de Ang II, subtipo AT<sub>1</sub>, torna-se eficaz resultando na diminuição da atividade nervosa simpática, prevenção do remodelamento do miocárdio, melhora da função cardíaca, vasodilatação periférica, aumento do consumo de oxigênio pelo miocárdio e aumento na tolerância à realização de exercício físico (GUAZZI et al., 1999).

#### 2.2.4 Interação entre o sistema renina-angiotensina e sistema nervoso simpático

Já tem sido descrito na literatura a interação entre os SNS e SRA na IC pela ativação recíproca entre os dois sistemas, comumente designada como ciclo vicioso do SNS - SRA na IC (COHN et al., 1984). Como citado anteriormente, no início da IC essa interação é benéfica, porém cronicamente leva ao agravamento do quadro clínico da IC (PACKER, 1988). Este sistema de retroalimentação positiva ocorre por meio da facilitação da liberação de NA pela ativação dos receptores de Ang II, mais especificamente do subtipo AT<sub>1</sub>. Além disso, há evidências da existência de todos os componentes do SRA nos terminais nervosos simpáticos, resultando na formação de Ang II pela ativação do SRA local e colaborando para uma hiperativação do SNS (LEVI, SILVER, MACKINS, SEYEDI & KOYAMA, 2002). Uma outra forma de retroalimentação positiva entre estes sistemas se dá pela facilitação da síntese e liberação de renina, substrato primordial para a formação de Ang II, dado ao aumento da atividade nervosa simpática renal, ou seja, a hiperatividade simpática exacerba a produção de renina, e conseqüentemente, aumenta a atividade do SRA (YONEMOCHI et al., 1998). Dessa forma, os SNS e SRA estão interligados e modulam reciprocamente a função contrátil do coração (BOHM, CASTELLANO, FLESCH, MAACK, MOLL, PAUL, SCHIFFER & ZOLK, 1998).

Atualmente, o desenvolvimento de agentes farmacológicos para o tratamento da IC vem se desenvolvendo rapidamente. Sabe-se que os fármacos mais utilizados no tratamento da IC são os  $\beta$ -bloqueadores, inibidores da ECA, antagonistas dos receptores de Ang II, subtipo AT<sub>1</sub>, e diuréticos (DENDORFER et al., 1998). Como se pode observar, a maior parte destas drogas está relacionada com a inibição dos SNS e SRA, demonstrando mais uma vez a intensa participação desses sistemas na progressão da IC. Portanto, torna-se muito comum no tratamento da IC a associação de medicamentos como os bloqueadores  $\beta$ -adrenérgicos (bloqueio da ação do SNS) com a administração de inibidores da ECA ou antagonistas dos receptores de Ang II, subtipo AT<sub>1</sub> (bloqueio da ação do SRA). Dentre os efeitos benéficos dos fármacos estão a atenuação da dessensibilização dos receptores  $\beta$ -adrenérgicos, restaurando o número de receptores  $\beta$ -adrenérgicos expressos no tecido cardíaco, e diminuição da atividade da proteína Gi, resultando indiretamente

no aumento da atividade da adelinatociclase (BOHM et al., 1998). Porém, pouco se sabe sobre as respostas celulares desencadeadas pela inibição destes sistemas utilizando o tratamento combinado de medicamentos. Alguns estudos demonstram que a inibição da atividade da ECA, além de minimizar a formação de Ang II e diminuir a degradação de bradicinina, promove aumento da expressão e da densidade dos receptores  $\beta$ -adrenérgicos, resultando na melhora da função cardíaca (YONEMOCHI et al., 1998). Sabe-se também que o uso de  $\beta$ -bloqueadores ameniza o grau de hipertrofia cardíaca desenvolvida na IC (LIAO, ASAKURA, TAKASHIMA, OGAI, ASANO, SHINTANI, MINAMINO, ASANUMA, SANADA, KIM, KITAMURA, TOMOIKE, HORI & KITAKAZE, 2004; SIMPSON, MCGRATH & SAVION, 1982). Dessa maneira, a caracterização do SRA num modelo animal que desenvolve cardiomiopatia induzida por hiperatividade simpática trará importantes informações sobre a modulação destes dois sistemas na progressão da cardiomiopatia para a IC.

#### 2.2.5 Modelo genético de cardiomiopatia induzida por hiperatividade simpática

Com o advento de técnicas de DNA recombinante, modelos animais geneticamente modificados foram produzidos com o intuito de mimetizar diversas condições patológicas e contribuir para o melhor entendimento dos mecanismos celulares envolvidos na origem e progressão das patologias.

Recentemente, foi descrito na literatura um modelo genético de cardiomiopatia induzida por hiperatividade simpática (BRUM et al., 2002). Esse modelo consiste na deleção dos receptores  $\alpha_{2A}$  e  $\alpha_{2C}$ -adrenérgicos em camundongos. Estes camundongos apresentam concentrações elevadas de NA plasmática, o que sugere hiperatividade do SNS. Além disso, esses animais apresentam 50% de mortalidade aos sete meses de idade (FIGURA 1) (BRUM et al., 2002). Cronicamente, as conseqüências deletérias desta hiperatividade simpática são diminuição na contratilidade cardíaca, perda de cardiomiócitos e intolerância ao exercício físico com diminuição significativa na capacidade máxima de realização do exercício.

Os receptores  $\alpha_2$ -adrenérgicos regulam a atividade simpática por meio de diferentes mecanismos. No bulbo rostro-ventro-lateral, os receptores  $\alpha_{2A}$ -adrenérgicos são pós-sinápticos e regulam o tônus simpático. Quando ativados, estes receptores desencadeiam bradicardia e hipotensão (ALTMAN, TRENDELENBURG, MACMILLAN, BERNSTEIN, LIMBIRD, STARKE, KOBILKA & HEIN, 1999). Em neurônios simpáticos periféricos ambos os receptores  $\alpha_{2A}$ - e  $\alpha_{2C}$ -adrenérgicos estão localizados no terminal pré-sináptico e regulam a liberação do neurotransmissor, no caso a NA (HEIN, ALTMAN & KOBILKA, 1999). Quando ativados, eles inibem a liberação da NA pelo terminal nervoso simpático em que se encontram e por isso são comumente denominados “autorreceptores”. Portanto, os camundongos com deleção dos receptores  $\alpha_{2A}$  e  $\alpha_{2C}$ -adrenérgicos (KO) constituem-se no primeiro modelo experimental a ser descrito na literatura que desenvolve cardiomiopatia induzida por hiperatividade simpática, sendo um ótimo modelo para estudar a interação entre o SRA e o SNS na cardiomiopatia induzida pela hiperatividade simpática.

Temos como hipótese que o SRA cardíaco estará hiperativado durante a progressão da cardiomiopatia induzida por hiperatividade simpática em camundongos KO, uma vez que o SNS exerce importante papel na ativação deste sistema no coração. A hiperatividade do SRA local resultará no remodelamento ventricular esquerdo e ativação direta do SNS, contribuindo para o agravamento da disfunção cardíaca observado neste modelo animal de hiperatividade simpática.

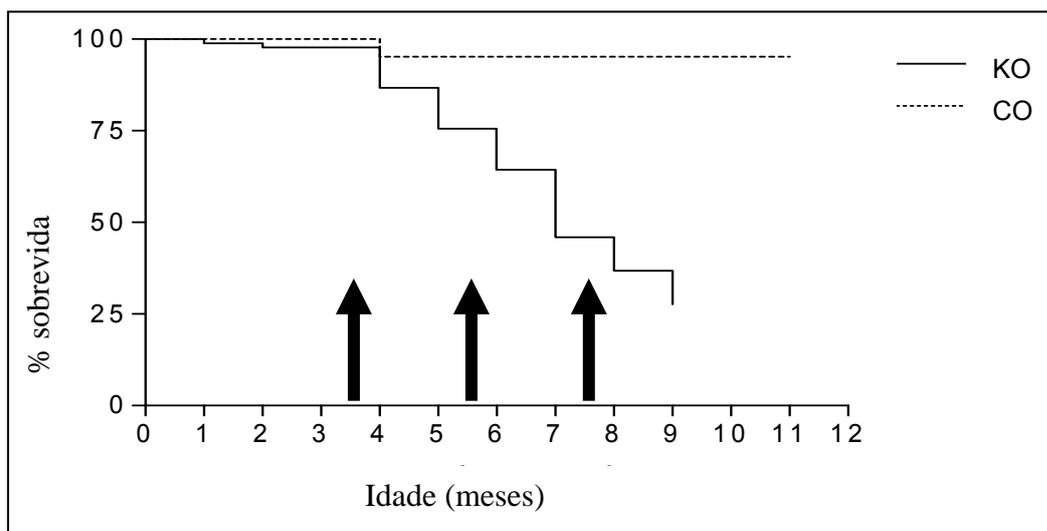


FIGURA 1- Taxa de sobrevivência em camundongos controle (CO) e com deleção dos receptores  $\alpha_{2A}/\alpha_{2C}$  adrenérgicos (KO) ao longo de 12 meses.

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 Geral

Caracterizar a participação do SRA na cardiomiopatia induzida por hiperatividade simpática em camundongos com deleção dos receptores  $\alpha_{2A}$  e  $\alpha_{2C}$ -adrenérgicos.

#### 3.2 Específicos

Estudar em camundongos controle e KO aos três e sete meses de vida:

- ✓ A tolerância à realização de esforço físico;
- ✓ O comportamento da pressão arterial e frequência cardíaca no repouso;
- ✓ A função ventricular;
- ✓ O peso das vísceras e a razão peso úmido/seco dos pulmões;
- ✓ A morfologia e morfometria cardíacas;
- ✓ A expressão de Ang II cardíaca;
- ✓ A atividade da ECA no coração, rim, pulmão e soro;
- ✓ A atividade da renina plasmática;
- ✓ A expressão dos receptores de Ang II, subtipos  $AT_1$  e  $AT_2$  no coração;
- ✓ A expressão gênica do angiotensinogênio cardíaco;
- ✓ A expressão da renina nos rins;
- ✓ As concentrações de NA cardíaca e circulante;

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 Amostra

Para a realização do presente projeto de pesquisa foram utilizados camundongos machos com deleção dos receptores  $\alpha_{2A}$  e  $\alpha_{2C}$ -adrenérgicos e camundongos controle, ambos da linhagem C57/BL6, provenientes do Biotério Central da Faculdade de Medicina da USP.

Os camundongos utilizados neste estudo foram mantidos no Biotério do laboratório de Fisiologia Celular e Molecular do Exercício, com temperatura controlada entre 22 e 25°C, e ciclo claro-escuro invertido 12:12 horas. A inversão do ciclo claro-escuro foi realizada por um *timer* instalado na sala do Biotério. Água e comida foram administradas *ad libitum*. O controle ponderal foi realizado por balança Gehaka durante o período do estudo.

Todos os procedimentos cirúrgicos e protocolos foram realizados de acordo com os Princípios Éticos de Experimentação animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA, [www.cobea.org.br](http://www.cobea.org.br))<sup>4</sup>. O projeto de pesquisa intitulado: Caracterização da participação do sistema renina-angiotensina cardiomiopatia induzida por hiperatividade simpática foi aprovado pelo Comitê de Ética da EEFEU SP (n° 059).

### 4.2 Identificação dos animais

Os animais foram identificados com um dispositivo introduzido subcutaneamente no dorso, após anestesia com halotano. Cada dispositivo continha um código com letras e números, o qual foi identificado por leitor automático.

<sup>4</sup>Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA, [www.cobea.org.br](http://www.cobea.org.br))

### 4.3 Genotipagem

Para a genotipagem dos camundongos KO, foi extraído DNA genômico pela biópsia realizada na orelha esquerda dos animais. A genotipagem foi realizada pela reação em cadeia pela polimerase (PCR - *polymerase chain reaction*) em termociclador utilizando oligonucleotídeos iniciadores (*primers*) para a detecção dos genes intactos e com ruptura dos genes dos receptores  $\alpha_{2A}$  e  $\alpha_{2C}$ -adrenérgicos.

Oligonucleotídeos para genotipagem dos receptores  $\alpha_{2A}$ -adrenérgicos:

WTA *sense*: 5' CTG CTC ATG CTG TTC ACA GTC ATT TG3'

WTA *antisense*: 5' CCA CAC GGT GAC AAT GAT GGC CTT3'

Neo/*sense*: 5' CGA GAT CCA CTA GTT CTA GCC TCG3'

Oligonucleotídeos para genotipagem dos receptores  $\alpha_{2C}$ -adrenérgicos:

WTC *sense*: 5' CAT CTT GTC CTC CTG CAT AGG CTC3'

WTC *antisense*: 5' TCT CAT CCG GCT CCA CTT CAG TG3'

Neo/*sense*: 5' GGG AGG ACA ATA GCA GGC ATG CTG3'

### 4.4 Caracterização fenotípica dos camundongos com deleção dos receptores $\alpha_{2A}$ e $\alpha_{2C}$ -adrenérgicos

Antes de estudar o comportamento do SRA, realizamos uma caracterização fenotípica deste modelo animal de cardiomiopatia induzida por hiperatividade simpática ao longo do tempo para melhor compreendermos a progressão da doença, uma vez que este é o primeiro modelo animal que apresenta hiperatividade simpática crônica. Os métodos utilizados para a caracterização fenotípica deste modelo de camundongos KO aos três e sete meses de idade (onde a cardiomiopatia encontra-se em estágio inicial e avançado, respectivamente) estão descritos abaixo.

#### 4.4.1 Teste de tolerância ao esforço físico

Algumas anormalidades cardíacas podem ser aparentes somente após a realização de um exercício máximo até a exaustão. Em trabalhos anteriores de nosso laboratório foi observada uma excelente correlação entre os índices de disfunção cardíaca durante o exercício físico e a fração de encurtamento ventricular mesmo antes dos sinais clínicos de cardiomiopatia estarem presentes nos camundongos KO (BRUM et al., 2002).

A capacidade máxima de realização do exercício físico foi estimada pelo teste progressivo até a exaustão em esteira rolante (FERREIRA, ROLIM, GRANÁ, BARTHOLOMEU & BRUM, 2004). Foi realizado um exercício progressivo escalonado até a exaustão em esteira rolante, onde a velocidade inicial da esteira foi de seis m/min sem haver inclinação na esteira. A cada três minutos, a velocidade da esteira sofreu um acréscimo de três m/min até a exaustão do animal. As variáveis medidas foram a velocidade final (m/min) e a distância total percorrida (metros) por cada animal durante o teste máximo.

#### 4.4.2 Medidas hemodinâmicas

Foram realizadas medidas indiretas de pressão arterial caudal e frequência cardíaca pelo método de pletismografia de cauda (*Kent Scientific*, EUA) (MEDEIROS, OLIVEIRA, GIANOLLA, CASARINI, NEGRAO & BRUM, 2004). O camundongo foi colocado numa caixa restritora aquecida o suficiente para dilatar a arterial caudal. Em seguida, um esfignomanômetro (adaptado para camundongos) foi colocado na cauda do animal e insuflado até a obstrução total do fluxo sanguíneo para a artéria caudal. A pressão do aparelho foi então diminuída lentamente até a captação dos primeiros picos de pressão arterial sistólica. O sinal de pressão arterial foi captado por um transdutor eletromagnético (Statham, P23Dd) localizado na cauda do animal, que por sua vez foi conectado a um amplificador (*General Purpose Amplifier-Stemtech*, Inc.). O sinal foi repassado para um conversor de sinal analógico da pressão arterial para digital (Stemtech, Inc) e registrado em tempo real no microcomputador (*Gateway*

2000, 4DX2, 66V), sendo analisado pelo programa AT/CODAS com uma frequência de amostragem de 100-Hz por canal.

Foram realizadas 10 medidas de pressão arterial para cada animal. Foram eliminados os dois valores mais altos e mais baixos de pressão e então, calculada a média dos valores restantes.

#### 4.4.3 Medidas ecocardiográficas

A avaliação da função ventricular foi realizada pelo ecocardiograma. As medidas ecocardiográficas seguiram as recomendações do Comitê de Padronização do modo M (monodimensional) da Sociedade Americana de Ecocardiografia (SAHN, DEMARIA, KISSLO & WEYMAN, 1978). É importante salientar que a acurácia e reprodutibilidade do exame ecocardiográfico transtorácico em estimar as dimensões e a função do ventrículo esquerdo em roedores têm sido confirmada em uma série de estudos (GUAZZI et al., 1999; NIENABER, TACHIBANA, NAGA PRASAD, ESPOSITO, WU, MAO & ROCKMAN, 2003; SANTOS et al., 2006).

O exame ecocardiográfico transtorácico foi realizado nos camundongos controle e KO aos três e sete meses de idade. Os exames foram realizados por um único observador muito bem treinado em realizar ecocardiograma em camundongos. Para cada exame realizado foi coletado um total de cinco medidas para cada variável, sendo calculados posteriormente, a média, o desvio padrão da média e o erro padrão da média dessas medidas.

O exame ecocardiográfico foi realizado nos animais sob anestesia com halotano em fluxo contínuo de oxigênio misturado ao anestésico, mantendo a frequência cardíaca em valores semelhantes entre os grupos para evitar influência da mesma sobre os índices de contratilidade cardíaca. O animal anestesiado foi colocado em decúbito dorsal em uma mesa cirúrgica apropriada para o posicionamento do transdutor no hemitórax esquerdo do animal. Foi utilizado o equipamento SEQUOIA 512 (ACUSON Corporation, Mountain View, CA), com transdutor de 15 MHz. As imagens foram feitas a uma frequência de cerca de 14 MHz, para a otimização da resolução e a penetração do animal. Para registro das

imagens foi utilizado gel de transmissão para ultra-som de viscosidade média/alta (General Imaging Gel, ATL, Reedsville, USA). As imagens foram armazenadas em fitas de videocassete (Sony SVO-9500 MD) e em papel fotográfico geradas através da impressão colorida (Sony, Color Video Printer Mavigraph UP-5600 MDU). A partir da visualização do ventrículo esquerdo (corte transversal) em nível dos músculos papilares foi realizado o modo M e obtidas as medidas das seguintes variáveis: diâmetro diastólico (DDiaVE) e sistólico (DSisVE) do ventrículo esquerdo, a espessura do septo interventricular na diástole (SIVDia), a espessura do septo interventricular na sístole (SIVSis) e da parede posterior do ventrículo esquerdo em sístole (PPSis) e diástole (PPDia). Além dessas medidas, foram calculadas a fração de encurtamento (FS) e a fração de ejeção (FE) (FIGURA 2).

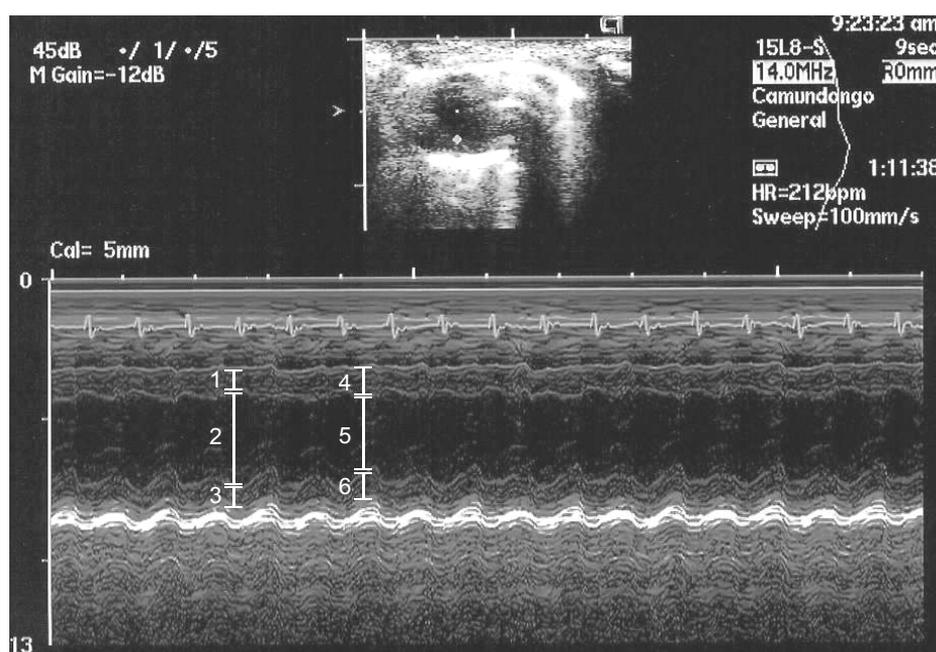


FIGURA 2- Análise ecocardiográfica em modo monodimensional realizada em camundongos. 1- espessura do septo interventricular na diástole; 2- diâmetro diastólico do ventrículo esquerdo; 3- espessura da parede posterior do ventrículo esquerdo na diástole; 4- espessura do septo interventricular na sístole; 5- diâmetro sistólico do ventrículo esquerdo; 6- espessura da parede posterior do ventrículo esquerdo na sístole.

#### 4.4.4 Sacrifício e coleta de tecidos

Vinte e quatro horas após o último experimento, um grupo de animais foi sacrificado por deslocamento cervical e outro grupo por perfusão tecidual, métodos rápidos e livres de sofrimentos prolongados, conforme normas do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA).

Após o sacrifício dos camundongos controle e KO, foi realizada a excisão do coração para ulterior pesagem, e em seguida, foram coletados sangue, pulmões, gorduras peritoneal e rins. O peso total de cada víscera foi corrigido pelo peso corporal e comparado entre os grupos. Além disso, avaliamos a razão peso úmido/seco dos pulmões dos camundongos controle e KO com o intuito de analisar a retenção hídrica destes animais. Após o sacrifício os pulmões foram pesados, permaneceram 48 horas na estufa (37°C) e foram reavaliados para a análise da razão peso úmido/seco.

O sangue foi centrifugado para separação do soro e do plasma, sendo que o soro foi destinado à dosagem da atividade da ECA e o plasma foi utilizado para a dosagem da atividade de renina e análise das concentrações de noradrenalina. As amostras de soro e plasma foram mantidas em freezer -70°C para ulterior processamento e realização dos experimentos.

Uma parte dos camundongos de cada grupo teve os corações reservados para a dosagem da atividade da ECA, avaliação da expressão protéica (receptores de Ang II, subtipos AT<sub>1</sub> e AT<sub>2</sub> cardíacos, e renina nos rins) e análise das concentrações de noradrenalina, e outra parte para a análise morfológica cardíaca. Nestes últimos, os corações foram submetidos à separação das câmaras em átrios, ventrículo direito (VD) e ventrículo esquerdo (VE), sendo que o septo ventricular em sua totalidade fez parte do ventrículo esquerdo. Em seguida, as câmaras foram pesadas separadamente, entretanto, apenas os átrios foram pesados conjuntamente. Logo em seguida, os ventrículos esquerdos foram imediatamente imersos em formalina tamponada (10%) por 48 horas, para posterior processamento histológico.

#### 4.4.5 Análise morfométrica cardíaca

Como o SRA está diretamente envolvido no remodelamento cardíaco associado às doenças cardiovasculares, realizamos a análise morfométrica cardíaca nos camundongos controle e KO aos três e sete meses de idade.

Após 48 horas de fixação, o ventrículo esquerdo foi submetido ao processamento histológico habitual, com cortes de quatro micra e coloração por hematoxilina-eosina. A análise morfométrica cardíaca foi realizada pela medida do diâmetro dos miócitos e da avaliação do grau de fibrose do miocárdio. Estes experimentos foram realizados em colaboração com o Prof. Dr. José Eduardo Krieger (InCor-FMUSP).

A medida do diâmetro transverso dos miócitos foi realizada em sistema computadorizado (LEICA QUANTIMET 500), com aumento de 400x. Os miócitos utilizados para medida estavam localizados na parede livre do ventrículo esquerdo e orientados em corte longitudinal. O critério de escolha foi a integridade do miócito e a localização central do núcleo. O diâmetro dos miócitos foi considerado a partir de uma média de 10 valores medidos para cada animal, para determinação do grau de hipertrofia do ventrículo esquerdo.

Uma outra parte dos ventrículos esquerdos armazenados em formalina foi destinada à análise quantitativa de colágeno. Os ventrículos esquerdos foram cortados em cinco níveis eqüidistantes (anéis) de cinco  $\mu\text{m}$  ao longo de seu maior eixo. Os anéis foram embebidos em parafina e corados com ácido pícrico e *sírius red*, que coram o cardiomiócito e o colágeno respectivamente (JUNQUEIRA, COSSERMELLI & BRENTANI, 1978). A seguir, o grau de fibrose do miocárdio foi avaliado pelo método de volumetria de pontos através de microscópio óptico. A fração de volume de colágeno cardíaco está expressa em porcentagem referente ao grupo controle.

Após a caracterização fenotípica dos camundongos controle e KO aos três e sete meses de idade iniciamos a caracterização do SRA nestes animais.

## 4.5 Caracterização do sistema renina-angiotensina

Para a caracterização do SRA nos animais com deleção dos receptores  $\alpha_{2A}/\alpha_{2C}$  adrenérgicos aos três e sete meses de idade utilizamos técnicas que analisam a atividade de enzimas específicas do SRA como a renina, peptidase chave na formação da Ang I, e a enzima conversora de angiotensina, metaloprotease responsável pela conversão de Ang I em Ang II. Além disso, analisamos a expressão protéica dos receptores de Ang II cardíacos, subtipos AT<sub>1</sub> e AT<sub>2</sub>, expressão gênica do angiotensinogênio cardíaco e expressão protéica da renina nos rins.

### 4.5.1 Quantificação de Ang II cardíaca

Para a quantificação da Ang II cardíaca utilizamos a técnica de imunohistoquímica. Utilizamos um anticorpo específico para a identificação da expressão de Ang II do tipo policlonal coelho (Península, Belmont, CA, EUA) com diluição 1:400. O controle negativo do método foi realizado omitindo-se o anticorpo primário. A seguir, a técnica será descrita em detalhes.

#### *Preparação dos cortes*

Os blocos de tecido cardíaco foram cortados em micrótomo com navalhas descartáveis com espessura de quatro micra e aderidos em lâminas gelatinizadas. As lâminas com os cortes permaneceram na estufa (Fabber-Primar, São Paulo, Brasil) a 60°C por duas horas e em seguida foram armazenadas a temperatura ambiente.

### *Processo de gelatinização das lâminas*

Para o preparo da gelatina que serviu de revestimento para as lâminas, 2,5 gramas de gelatina purificada tipo A (Sigma Chemical Co, St Louis, EUA) foram adicionados em 500 ml de água destilada a 50°C. Quando esta solução atingiu 30°C, adicionou-se 0,25 gramas de sulfato de potássio crômico (Sigma Chemical Co, St Louis, EUA). Em seguida esta solução foi filtrada.

As lâminas foram previamente lavadas em solução de álcool/éter (1:1). Para gelatinizar, as lâminas foram mergulhadas por alguns segundos na solução de gelatina. Para retirar o excesso da solução de gelatina, as lâminas foram inclinadas sobre papel toalha e posteriormente acondicionadas a 4°C.

### *Desparafinização para reações de imunohistoquímica*

Antes de realizar a técnica de imunohistoquímica, as lâminas passaram por um processo de desparafinização. Após 30 minutos em estufa a 60°C, as lâminas foram imersas em xilol durante nove minutos (três vezes). A seguir, as lâminas foram mergulhadas em álcool absoluto por cinco minutos (duas vezes) e em seguida, em álcool 96% por três minutos (duas vezes). Posteriormente as lâminas foram lavadas com água destilada por duas vezes.

### *Banho em tampão citrato e técnica de micro-ondas*

A técnica de micro-ondas foi utilizada para aumentar a exposição antigênica, uma vez que o processo de parafinização pode ocorrer o mascaramento de antígenos no tecido, dificultando assim sua detecção. Para tanto, as lâminas foram imersas em tampão citrato (2,1 grama de ácido cítrico mono hidratado dissolvidos em 1000 ml de água destilada, pH 6.0) e levadas para o forno micro-ondas com potência de 2400 watts. Este procedimento foi realizado uma vez durante dez minutos seguido de mais cinco minutos. Finalizando este processo, as lâminas foram hidratadas em solução salina tris-tamponada (TBS) pH 7.6.

*Reação de imunohistoquímica (estreptavidina-biotina/fosfatase alcalina)*

Após a técnica de micro-ondas, foi realizado o bloqueio da avidina endógena por 15 minutos seguido do bloqueio da biotina endógena por 15 minutos e do bloqueio de ligações inespecíficas com soro não-imune de cavalo (*Vector, Burlingame*, EUA) na diluição de 1:70 por 30 minutos. Os cortes foram incubados com o anticorpo primário anti-Ang II durante a noite a 4°C. A seguir foram incubados com imunoglobulina biotilizada de cabra anti-coelho (*Vector, Burlingame*, EUA) por 30 minutos. Finalmente, foi utilizado o corante *fast-red* (5 mg) diluído em uma solução denominada substrato.

Para preparar o substrato, duas mg de fosfato de naftol As-MX (*Sigma Chemical Co, St Louis*, EUA) foram diluídos em 200 µL de N, N dimetilformamida (*Merck*, Rio de Janeiro, RJ). A seguir, a solução foi diluída em 9,8 ml de tampão Tris 0,1M (pH 8.2) e 20 µL de levamisol 1M (*Sigma Chemical Co, St Louis*, EUA) foram acrescentados.

A solução substrato + *fast red* depois de ser preparada foi filtrada, e então usada como corante. O tempo médio de revelação para o antígeno foi de 12 minutos em média e a contra-coloração foi feita com hemalumbre de Mayer. As células positivas neste tipo de reação apresentaram cor vermelha (FIGURA 3).



FIGURA 3 - Imunomarcção para Ang II em cortes histológicos do ventrículo esquerdo de camundongos.

#### 4.5.2 Medida da atividade da enzima conversora de angiotensina

As amostras de soro, tecido cardíaco, renal e pulmonar foram homogeneizadas em tampão apropriado (para cada 100 mg de tecido foi utilizado 1mL de Tris-HCl, 0,1 M, contendo 50mM de NaCl). O homogenato foi submetido à centrifugação a 3000 rpm durante 15 minutos a 4°C. O sobrenadante foi armazenado a -70°C até o dia da dosagem enzimática.

Para o ensaio foram utilizados 5 µl de soro, 20 µl de homogeneizado cardíaco, 1 µl de homogenato renal e 5 µl de homogenato pulmonar, mantidos sob incubação com uma solução de Abz-FRK(Dnp)P-OH (Abz = ácido ortho-aminobenzóico; Dnp = dinitrophenil) 15 µM em tampão (Tris-HCl 1mM, NaCl 50mM e ZnCl<sub>2</sub> 10µM) num volume final de 200 µl. Numa segunda etapa, a atividade enzimática foi determinada de forma contínua em fluorímetro ( $\lambda_{em} = 420nm$  e ( $\lambda_{ex} = 320nm$ ), isto é, medindo-se a fluorescência por 20 minutos (uma leitura por minuto). Este método se baseia na utilização de um peptídeo fluorescente (Abz-FRK(Dnp)P-OH) que é clivado com alta afinidade pela ECA ( $K_{cat}/K_m = 45,4 \cdot 10^5 s^{-1}$ ) (ARAUJO,

MELO, CESARI, JULIANO, JULIANO & CARMONA, 2000). Como controle negativo, a hidrólise do Abz-FRK(Dnp)P-OH foi abolida no homogenato de tecido por 0,5M de captopril (inibidor da ECA).

A partir da leitura das amostras foi obtida uma curva de fluorescência por unidade de tempo e a inclinação desta curva resultou na atividade da ECA, e finalmente convertida em  $\mu\text{mol}$  de substrato hidrolisado por minuto.

A atividade enzimática cardíaca, renal e pulmonar foi normalizada pelo conteúdo de proteína de cada amostra, determinada pelo método de Bradford (BRADFORD, 1976). Finalmente, a atividade da ECA foi expressa em  $\text{uF} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{ml}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$  de proteína.

#### 4.5.3 Medida da atividade da renina plasmática

A atividade da renina plasmática foi avaliada para verificar se existe alteração na liberação de renina no plasma dos camundongos controle e KO aos três e sete meses de vida. Esta medida foi realizada pela técnica de radioimunoensaio (REN-CT2, CIS Bio *International*) para a determinação de Angiotensina I em plasma com EDTA. Este ensaio permite uma medida indireta da atividade da renina plasmática. Os resultados estão expressos em ng de Angiotensina I liberados por ml por hora (ng/ml/h de Ang I).

#### 4.5.4 Análise da expressão de proteínas

A análise da expressão protéica dos receptores de Ang II, subtipos AT<sub>1</sub> e AT<sub>2</sub>, no tecido cardíaco e da expressão da renina nos rins foi realizada utilizando a técnica de *Western blot*. Para isso, as amostras de tecido cardíaco coletadas foram imediatamente homogeneizadas com um polytron PTA 20S (*Brinkmann Instruments* PT 10/35) em tampão de extração (Na-EDTA 1mM, Na-EGTA 1mM, MgCl<sub>2</sub> 2mM, KCl 5mM, HEPES 25mM, PMSF 100 $\mu$ M, DTT 2mM, 0,1% Triton X-100, cocktail anti-protease P2714 Sigma 1:100). Os homogeneizados foram centrifugados por 20 min, a 12000 rpm numa temperatura de 4°C. O sobrenadante foi utilizado para quantificar

a concentração total de proteínas (BRADFORD, 1976). Então, cada amostra foi diluída em tampão Laemmli (Tris-HCl 240mM, SDS 0,8%, beta-mecaptoetanol 200mM, glicerol 40% e azul de bromofenol 0,02%) (LAEMMLI, 1970) na proporção de 1:1. Cada amostra contendo o Laemmli mais o precipitado foi submetida a uma rotação (spin) de 30 segundos e 60ug de proteína do sobrenadante foram submetidos à eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE 8%) no aparelho para minigel (Mini-Protean). Em cada gel foi aplicado como padrão um marcador de peso molecular com valores estabelecidos em: miosina (205-195 kDa),  $\beta$ -galactosidase (116 kDa), albumina de soro bovino (80 kDa) e ovalbumina (49,5 kDa).

A transferência das proteínas separadas no gel foi feita eletricamente para uma membrana de nitrocelulose utilizando-se um aparelho da Bio-Rad e durou por volta de 1h sob 100 volts (TOWBIN, OZBEY & ZINGEL, 2001). A ligação inespecífica de proteínas na membrana de nitrocelulose foi minimizada pela incubação destas com 10 ml de solução bloqueadora (leite desnatado Molico 5%, Tris 10 mM, NaCl 150 mM e *Tween* 20 0,02%) a 4°C por 2 horas na temperatura ambiente. Estas membranas foram posteriormente incubadas com anticorpos primários anti-receptores de Ang II, subtipo AT<sub>1</sub> e AT<sub>2</sub>, e anti-renina (anti AT<sub>1</sub>, 1:400, anti AT<sub>2</sub>, 1:400, anti-renina, 1:200 Santa Cruz *Biotechnology*, CA, USA) diluídos em solução bloqueadora (albumina bovina 3%, Tris 10 mM, NaCl 150 mM e *Tween* 20 0,02%) a 4°C por 2 horas. Em seguida as mesmas foram lavadas três vezes por dez minutos com solução basal. As bandas existentes nas membranas incubadas foram visualizadas pelo uso do Kit para detecção por quimiluminescência.

O método da quimiluminescência consiste nos seguintes passos: após incubação da membrana com o anticorpo primário, a membrana é novamente incubada por 1 hora com o anticorpo anti-IgG marcado com peroxidase em solução bloqueadora (1:1000). Em seguida as membranas foram lavadas novamente três vezes com solução basal e incubadas com 1 ml de cada um dos dois reagentes do kit por 1 minuto, e a seguir os filmes de raio-X foram expostos às membranas. Esta exposição durou entre meio e dois minutos, dependendo da concentração de proteína da amostra. Para medir a intensidade das bandas nas auto-radiografias, as figuras escaneadas foram analisadas utilizando o programa de análise de

densitometria óptica *Scion Image*, fornecido gratuitamente pela NIH (USA) via internet.

#### 4.5.5 Análise da expressão gênica do angiotensinogênio cardíaco

##### *Extração do RNA*

As amostras de tecido cardíaco foram homogeneizadas em 1 ml de Trizol (Invitrogen) e incubadas a temperatura ambiente por 15 minutos. Após essa fase, as amostras foram centrifugadas a 12500 rpm por 15 minutos a 4°C. A fase sobrenadante da solução foi transferida para novos tubos. Em seguida, foram adicionados 500µl de clorofórmio a cada amostra, e os tubos submetidos a forte agitação por 30 segundos e incubadas a temperatura ambiente por 15 minutos. Após essa fase, as amostras foram centrifugadas a 12500 rpm por 15 minutos a 4°C. A fase sobrenadante da solução foi transferida para novos tubos. Foram adicionados 500µl de álcool isopropílico, e os tubos foram incubados por 10 minutos. As amostras foram centrifugadas novamente por 12500 rpm por 10 minutos a 4°C. O sobrenadante foi descartado e o pellet de RNA lavado com 1ml de etanol 75%. Os tubos foram centrifugados por 5 minutos a 10000 rpm a 4°C. O sobrenadante foi descartado e os tubos mantidos a temperatura ambiente até a secagem quase completa do RNA, o qual foi posteriormente suspenso em 40µl de H<sub>2</sub>O DEPC.

As amostras de RNA foram diluídas na proporção de 1:100 em água, e analisadas por espectrofotometria (Ultrospec 2100 Pro, *Amersham Pharmacia Biotec*) nos comprimentos de onda de 260 a 280nm. As amostras selecionadas para os ensaios foram aquelas as quais a razão entre os comprimentos de onda (260/280nm) variou entre 1,6 e 2,0.

### *Reação em cadeia da polimerase em tempo real (real time RT-PCR)*

Neste ensaio foram utilizados os oligonucleotídeos iniciadores *sense* e *anti-sense* para os genes do Angiotensinogênio e da Ciclofilina. O ensaio da análise da expressão semiquantitativa das mensagens dos genes foi feito de acordo com o protocolo descrito por *Taqman Gold RT-PCR kit*. Nesse ensaio, a primeira fita de cDNA (1-6 µl) foi amplificada em 25 µl de reação contendo 12,5 µl de *Taqman* transcriptase reversa, 2x da mistura SYBR *Green* PCR Mastermix (*Applied Biosystems*) e primers específicos para o gene desejado (900nM). Utilizamos como controle normalizador a ciclofilina, uma vez que este gene não altera sua expressão cardíaca neste modelo de cardiomiopatia induzida por hiperatividade simpática.

Os passos da reação em cadeia da polimerase em tempo real foram os seguintes: 1) denaturação a 95°C por 10 minutos para a ativação da enzima AmpliTaq Gold; 2) 45 ciclos a 95°C por 15 segundos (denaturação) e 60°C por 1 minuto (anelamento). As fluorescências foram lidas em detector ABI PRISM 7700 (*Applied Biosystems*). Estes ensaios realizados em colaboração com o Prof. Dr. José Eduardo Krieger (InCor-FMUSP).

Oligonucleotídeos para o angiotensinogênio:

*sense*: 5' CTG CTC ATG CTG TTC ACA GTC ATT TG3'

*antisense*: 5' CCA CAC GGT GAC AAT GAT GGC CTT3'

#### **4.6 Determinação das concentrações de NA cardíaca e circulante**

As concentrações de noradrenalina cardíaca e circulante foram determinadas pelo método de cromatografia líquida de alto rendimento (HPLC). Estes experimentos foram realizados em colaboração com a Profa Dra Dulce Casarini da UNIFESP.

#### 4.7 Análise estatística

Os dados obtidos neste estudo estão apresentados na forma de média  $\pm$  erro padrão. Utilizamos análise de variância de dois fatores (ANOVA) com *post-hoc* de Tukey, uma vez que tínhamos como fatores principais o genótipo e idade. Para todas as análises, foi adotado como nível de significância  $p \leq 0,05$ .

## 5 RESULTADOS

Apresentaremos na presente seção os resultados do estudo realizado com camundongos controle e camundongos KO, subdivididos de acordo com a TABELA 1.

TABELA 1- Amostra utilizada e distribuição entre os grupos controle (CO) e com deleção dos receptores  $\alpha_{2A}/\alpha_{2C}$  adrenérgicos (KO)

	CO		KO	
	3 meses	7 meses	3 meses	7 meses
n	21	19	24	26

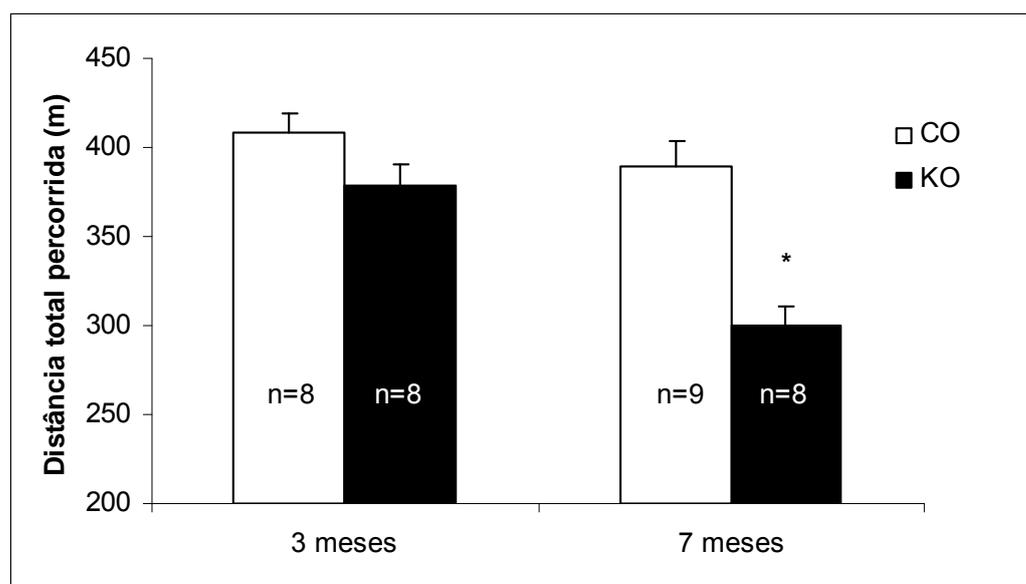
### 5.1 Caracterização fenotípica dos camundongos com deleção dos receptores $\alpha_{2A}/\alpha_{2C}$ adrenérgicos

#### 5.1.1 Teste de tolerância ao esforço físico

O teste progressivo escalonado até a exaustão em esteira rolante pode ser utilizado como importante ferramenta na avaliação da tolerância à realização de esforço físico em modelos animais geneticamente modificados (BERNSTEIN, 2003). Sendo assim, visando avaliar a tolerância à realização de esforço físico, os

camundongos controle e KO foram submetidos a este teste aos três e sete meses de idade.

A FIGURA 4 mostra os valores de distância total percorrida durante o teste de esforço físico em camundongos controle e KO nas diferentes faixas etárias estudadas. Como pode-se observar na figura, aos três meses de idade não houve diferença significativa na distância total percorrida no teste de tolerância ao esforço físico entre os grupos controle e KO. Já aos sete meses de idade, os camundongos KO apresentaram uma significativa queda da distância total percorrida no teste em relação aos camundongos controle, caracterizando dessa forma a intolerância ao esforço físico nessa faixa etária.



\* Diferença significativa vs. grupos CO 7 meses, CO e KO 3 meses.

FIGURA 4 - Distância total percorrida no teste de esforço físico máximo em camundongos controle (CO) e com deleção dos receptores  $\alpha_{2A}$ / $\alpha_{2C}$  adrenérgicos (KO) aos três e sete meses de idade. Os dados foram comparados entre os grupos pela análise de variância de dois fatores (ANOVA) com *post-hoc* de Tukey ( $p < 0.05$ ).

### 5.1.2 Medidas hemodinâmicas

Para estudar o efeito da hiperatividade simpática nas medidas hemodinâmicas, avaliamos as variáveis pressão arterial e frequência cardíaca dos camundongos do grupo controle e camundongos com deleção dos receptores  $\alpha_{2A}/\alpha_{2C}$  adrenérgicos. Para isso utilizamos o método de pletismografia de cauda.

#### 5.1.2.1 Pressão Arterial

Os camundongos controle e KO não apresentaram diferença estatisticamente significativa na pressão arterial. Como pode-se observar na FIGURA 5, os valores de pressão arterial dos camundongos controle e KO foram semelhantes aos três e sete meses de idade. Esses resultados sugerem que os fatores idade e diferença entre genótipos não influenciam o comportamento da pressão arterial dos camundongos.

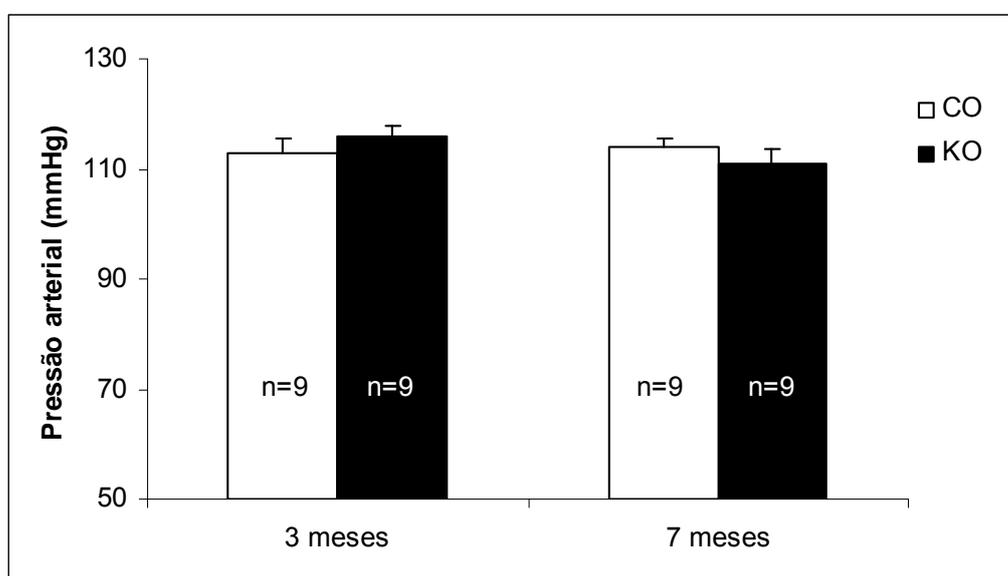
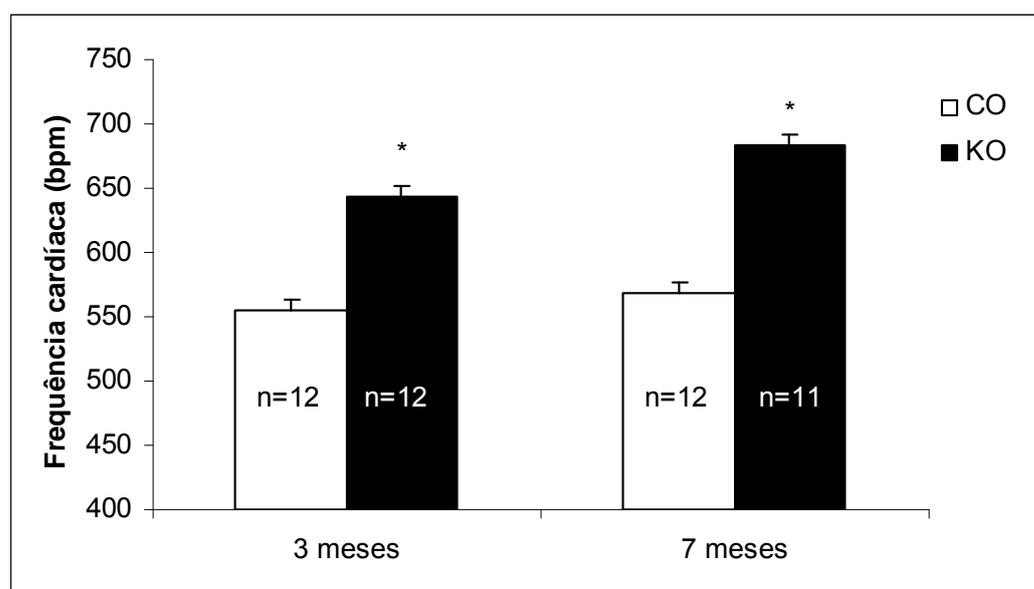


FIGURA 5 - Comportamento da pressão arterial dos camundongos controle (CO) e com deleção dos receptores  $\alpha_{2A}/\alpha_{2C}$  adrenérgicos (KO) aos três e sete meses de idade. Os dados foram comparados entre os grupos pela análise de variância de dois fatores (ANOVA).

### 5.1.2.2 Freqüência cardíaca

A FIGURA 6 mostra os valores de freqüência cardíaca de repouso dos camundongos controle e KO aos três e sete meses de idade. Os camundongos KO apresentaram valores de freqüência cardíaca significativamente superiores aos valores do grupo controle nas diferentes faixas etárias estudadas. Esses resultados sugerem que os camundongos KO apresentam taquicardia basal aos três e sete meses de idade. Vale a pena ressaltar que a taquicardia basal tem sido constantemente observada nesse modelo genético de hiperatividade do sistema nervoso simpático (BRUM et al., 2002).



\* Diferença significativa vs grupos CO.

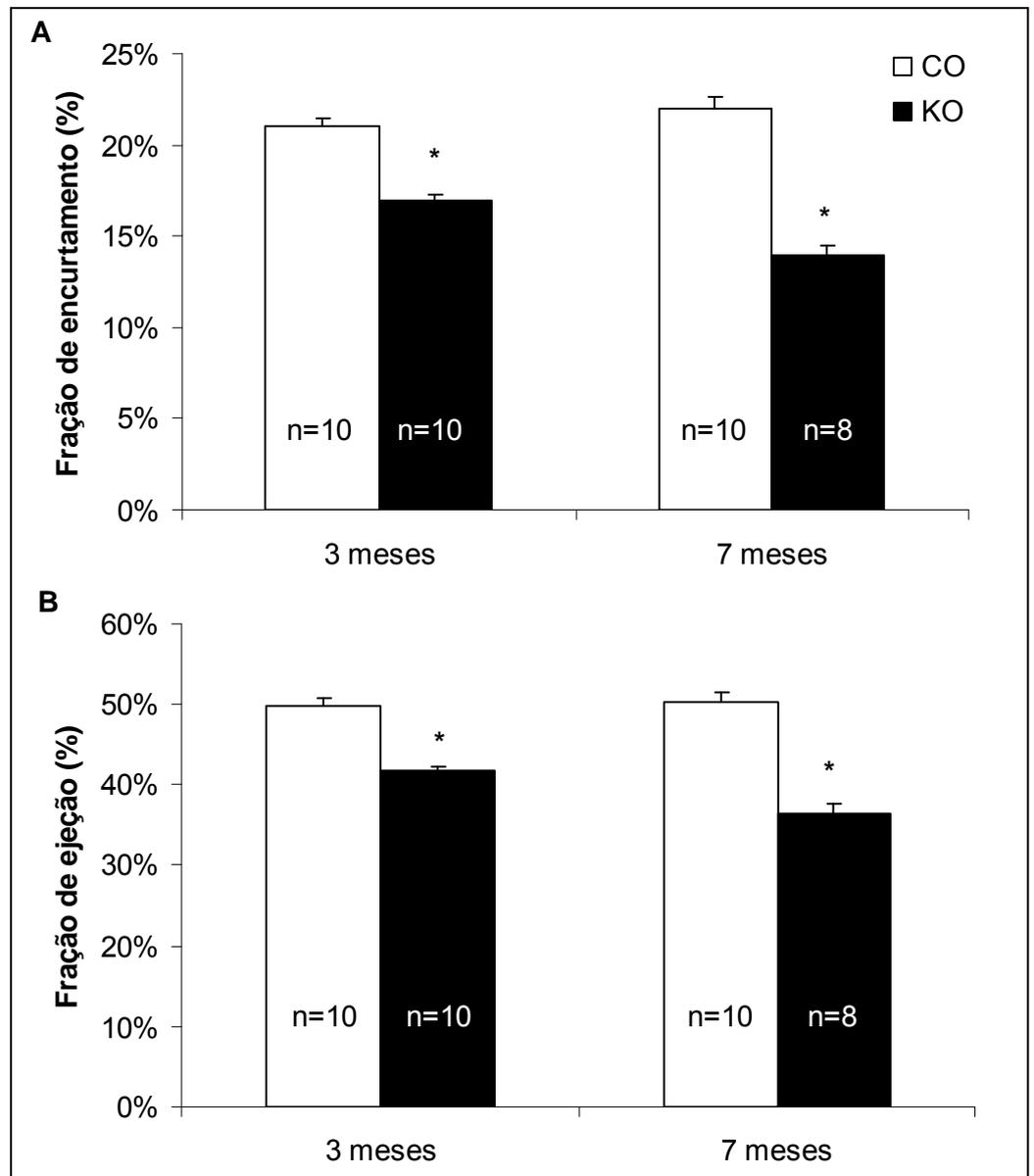
FIGURA 6 - Comportamento da freqüência cardíaca em camundongos controle (CO) e com deleção dos receptores  $\alpha_{2A}$ / $\alpha_{2C}$  adrenérgicos (KO) aos três e sete meses de idade. Os dados foram comparados entre os grupos pela análise de variância de dois fatores (ANOVA) com *post-hoc* de Tukey ( $p < 0.05$ ).

### 5.1.3 Medidas ecocardiográficas

Para avaliar a influência da hiperatividade nervosa simpática sobre os parâmetros funcionais e estruturais cardíacos dos camundongos com deleção dos receptores  $\alpha_{2A}/\alpha_{2C}$  adrenérgicos, realizamos as avaliações ecocardiográficas.

As FIGURAS 7A e 7B mostram índices cardíacos que avaliam a função sistólica dos camundongos controle e KO aos três e sete meses de idade. Conforme ilustrados na FIGURA 7A, aos três meses de idade os camundongos KO apresentaram uma diminuição da fração de encurtamento, que embora de pequena magnitude (16%), foi significativamente diferente quando comparada ao grupo controle. Aos sete meses de idade, essa disfunção sistólica se agravou ainda mais, onde observamos redução de 34% da fração de encurtamento nos camundongos KO.

Quando avaliou-se a fração de ejeção (FIGURA 7B), observamos que aos três meses de idade os camundongos KO apresentaram uma diminuição de 16% comparados aos camundongos do grupo controle. Como a fração de encurtamento, esta queda foi ainda mais acentuada aos sete meses de idade, onde observou-se uma diminuição de 28% da fração de ejeção dos camundongos KO.



\* Diferença significativa vs. grupos CO.

FIGURA 7 - Fração de encurtamento (A) e fração de ejeção (B) dos camundongos controle (CO) e com deleção dos receptores  $\alpha_{2A}/\alpha_{2C}$  adrenérgicos (KO) aos três e sete meses de idade. Os dados foram comparados entre os grupos pela análise de variância de dois fatores (ANOVA) com *post-hoc* de Tukey ( $p < 0.05$ ).

Além da função sistólica, analisamos alguns parâmetros estruturais cardíacos na tentativa de detectar algum tipo de remodelamento ventricular esquerdo decorrente da hiperatividade nervosa simpática apresentada pelos camundongos com deleção dos receptores  $\alpha_{2A}/\alpha_{2C}$  adrenérgicos.

Conforme pode-se observar na TABELA 2, aos sete meses de idade os camundongos KO apresentaram um aumento significativo dos diâmetros sistólico e diastólico final quando comparados aos camundongos do grupo controle. Esses dados sugerem que os camundongos KO apresentam dilatação do ventrículo esquerdo aos sete meses de idade associada à disfunção sistólica.

Quanto às demais variáveis morfológicas analisadas como diâmetro diastólico final do ventrículo esquerdo, diâmetro sistólico final do ventrículo esquerdo, espessura do septo intraventricular na diástole, espessura do septo intraventricular na sístole, espessura da parede posterior do ventrículo esquerdo na diástole, espessura da parede posterior do ventrículo esquerdo na sístole e massa do ventrículo esquerdo (MVE), não se observou diferença significativa entre os camundongos controle e KO nas faixas etárias de três e sete meses de idade (TABELA 2). Vale a pena ressaltar que durante o exame ecocardiográfico os animais estavam anestesiados e a frequência cardíaca dos animais foi mantida em valores próximos, evitando a influência desta sobre a contratilidade miocárdica.

TABELA 2- Freqüência cardíaca (FC) durante exame ecocardiográfico, diâmetro diastólico final do ventrículo esquerdo (DDiaVE), diâmetro sistólico final do ventrículo esquerdo (DSisVE), espessura do septo intraventricular na diástole (SIVDia), espessura do septo intraventricular na sístole (SIVSis), espessura da parede posterior do ventrículo esquerdo na diástole (PPVEDia), espessura da parede posterior do ventrículo esquerdo na sístole (PPVESis) e massa do ventrículo esquerdo (MVE) em camundongos controle (CO) e com deleção dos receptores  $\alpha_{2A}/\alpha_{2C}$  adrenérgicos (KO) aos três e sete meses de idade

	CO		KO	
	3 meses	7 meses	3 meses	7 meses
FC (bpm)	441±10	440±6	438±12	457±9
DDiaVE (cm)	0.38±0.01	0.38±0.01	0.37±0.01	0.41±0.01*
DSisVE (cm)	0.30±0.01	0.30±0.01	0.31±0.01	0,32±0.01*
SIVDia (mm)	0.06±0.001	0.07±0.001	0.06±0.001	0.07±0.002
SIVDsis (mm)	0.08±0.003	0.09±0.003	0.08±0.002	0.09±0.003
PPVEDia (mm)	0.06±0.001	0.07±0.001	0.05±0.001	0.07±0.002
PPVESis (mm)	0.08±0.003	0.09±0.002	0.07±0.002	0.09±0.003
MVE (g)	0.07±0.003	0.08±0.004	0.08±0.002	0.09±0.006
n	10	10	10	8

\* Diferença significativa vs. CO 7 meses, CO e KO 3 meses.

Os dados foram comparados entre os grupos pela análise de variância de dois fatores (ANOVA) com *post-hoc* de Tukey ( $p < 0.05$ ).

#### 5.1.4 Avaliação da massa corporal e peso das vísceras

Para estudar o efeito da hiperatividade nervosa simpática sobre a massa corporal dos animais, avaliamos o peso dos camundongos controle e KO aos três e sete meses de idade. Como ilustrado na FIGURA 8, aos três meses de idade os animais KO apresentaram uma diminuição significativa do peso corporal quando comparados aos animais do grupo controle. Já aos sete meses não encontramos diferença significativa entre os grupos. Vale a pena ressaltar que ambos os grupos aumentaram o peso corporal com o passar do tempo.

Quando avaliamos o peso da gordura retroperitoneal, pudemos observar que aos três e sete meses de idade os camundongos KO apresentaram uma significativa redução do peso desta quando comparados ao grupo de camundongos controle. Provavelmente, essa diminuição do peso da gordura retroperitoneal observada nos camundongos KO ocorreu em decorrência da hiperatividade nervosa simpática.

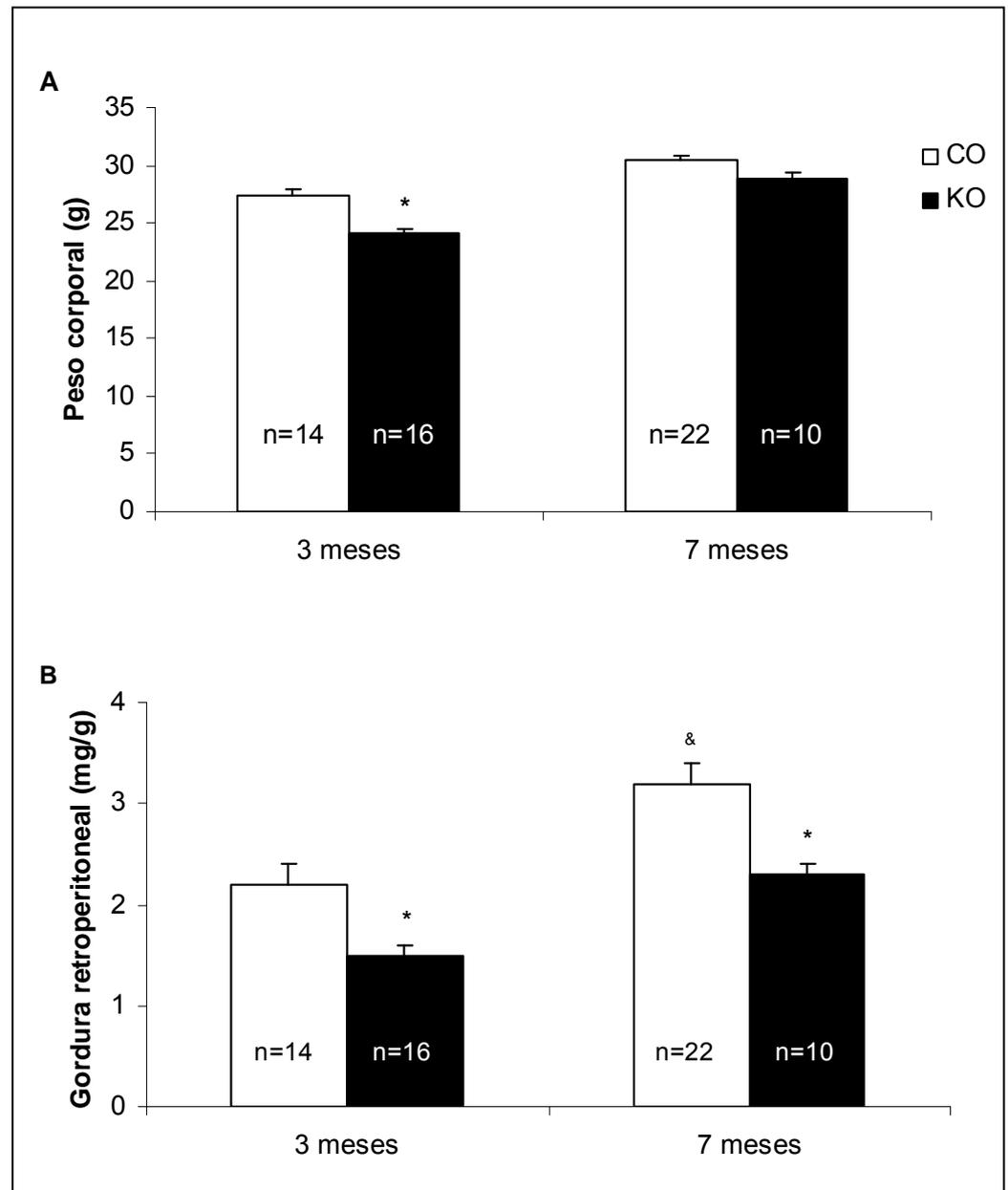
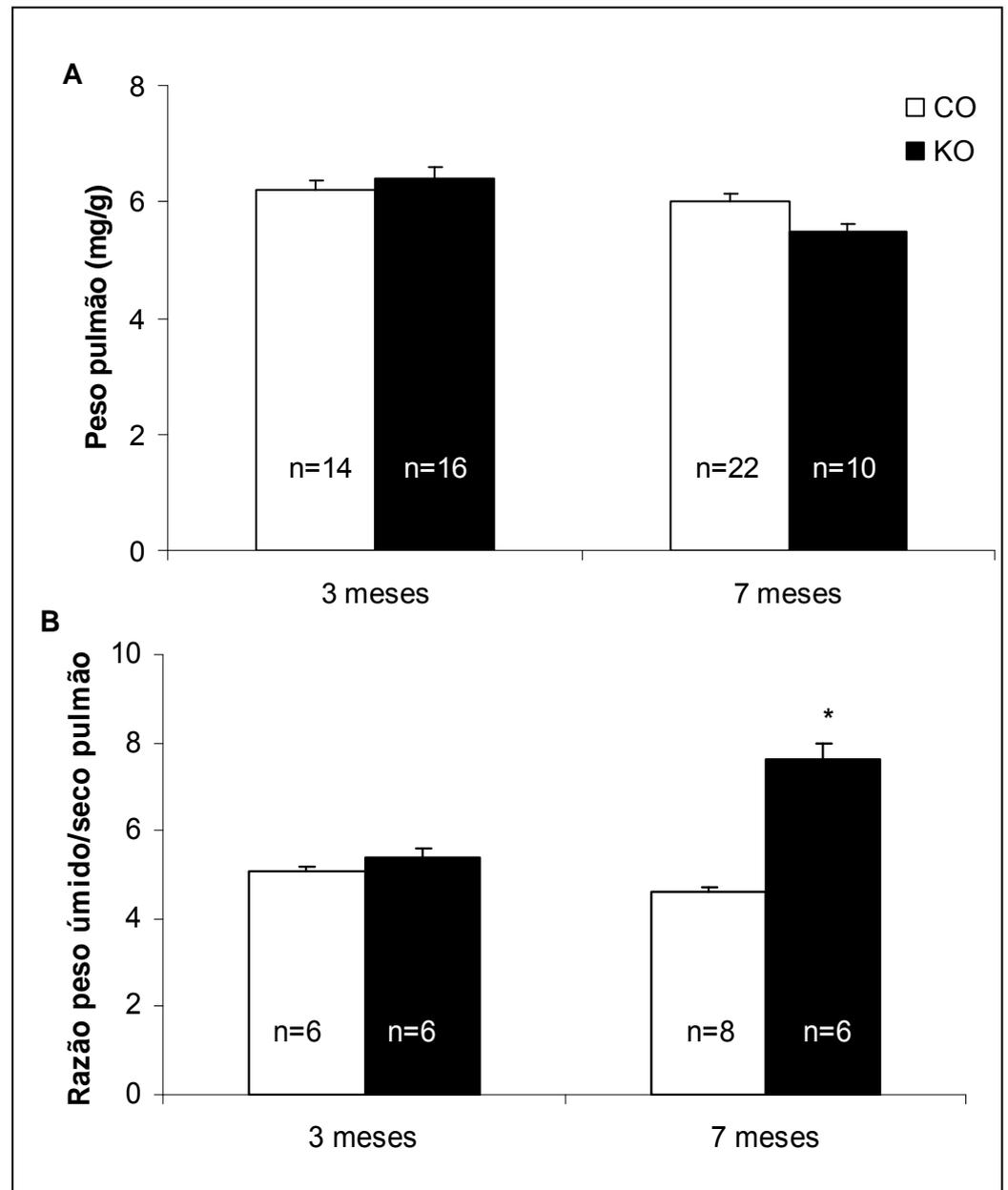


FIGURA 8 - Peso corporal (A) e peso da gordura retroperitoneal corrigida pelo peso corporal (B) de camundongos controle (CO) e com deleção dos receptores  $\alpha_{2A}/\alpha_{2C}$  adrenérgicos (KO) aos três e sete meses de idade. Os dados foram comparados entre os grupos pela análise de variância de dois fatores (ANOVA) com *post-hoc* de Tukey ( $p < 0.05$ ).

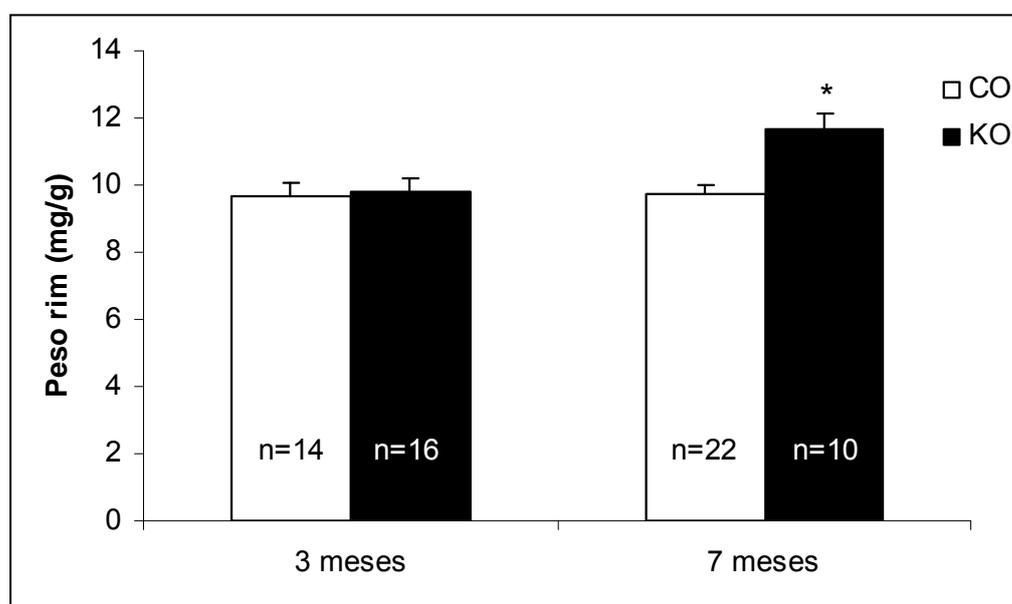
Conforme ilustrado na FIGURA 9A, quando avaliamos o peso dos pulmões dos camundongos controle e KO aos três e sete meses de idade não observamos diferenças significantes entre os grupos. Entretanto, quando avaliamos a razão peso úmido/seco dos pulmões dos animais, constatamos que aos sete meses de idade os camundongos KO apresentaram um aumento na razão de 65% quando comparados aos camundongos controle (FIGURA 9B). Dessa forma, os resultados do peso dos pulmões e da razão peso úmido/seco dos pulmões sugerem que os camundongos KO apresentam retenção hídrica aos sete meses de idade. Vale a pena ressaltar que a retenção hídrica, caracterizada pela formação de edema, é um bom parâmetro utilizado no diagnóstico da IC.



\* Diferença significativa vs. grupos CO 7 meses, CO e KO 3 meses.

FIGURA 9 - Peso dos pulmões corrigido pelo peso corporal (A) e razão do peso úmido/seco dos pulmões (B) dos camundongos controle (CO) e com deleção dos receptores  $\alpha_{2A}/\alpha_{2C}$  adrenérgicos (KO) aos três e sete meses de idade. Os dados foram comparados entre os grupos pela análise de variância de dois fatores (ANOVA) com *post-hoc* de Tukey ( $p < 0.05$ ).

Conforme pode-se observar na FIGURA 10, aos três meses de idade não houve diferença no peso dos rins dos camundongos controle e KO. Entretanto, aos sete meses de idade os camundongos KO apresentaram um aumento significativo no peso dos rins quando comparados aos camundongos do grupo controle. O peso dos rins dos camundongos foi avaliado devido ao fato deste ser um órgão-alvo da atividade nervosa simpática e controlar diretamente a atividade do SRA. Os dados sugerem que cronicamente a hiperatividade nervosa simpática leva ao aumento do peso dos rins dos camundongos com deleção dos receptores  $\alpha_{2A}/\alpha_{2C}$  adrenérgicos.



\* Diferença significativa vs. grupos CO 7 meses, CO e KO 3 meses.

FIGURA 10 - Peso dos rins corrigido pelo peso corporal dos camundongos controle (CO) e com deleção dos receptores  $\alpha_{2A}/\alpha_{2C}$  adrenérgicos (KO) aos três e sete meses de idade. Os dados foram comparados entre os grupos pela análise de variância de dois fatores (ANOVA) com *post-hoc* de Tukey ( $p < 0.05$ ).

### 5.1.5 Análise morfométrica cardíaca

Para avaliar as possíveis alterações morfométricas cardíacas decorrentes da hiperatividade simpática, comparamos entre os camundongos controle e KO aos três e sete meses de idade o peso do coração e das câmaras cardíacas. Os valores apresentados estão corrigidos pelo peso corporal.

Como pode-se observar na TABELA 3, os camundongos KO não apresentaram diferenças significantes no peso do coração e das câmaras cardíacas quando comparados aos camundongos do grupo controle nas diferentes faixas etárias estudadas.

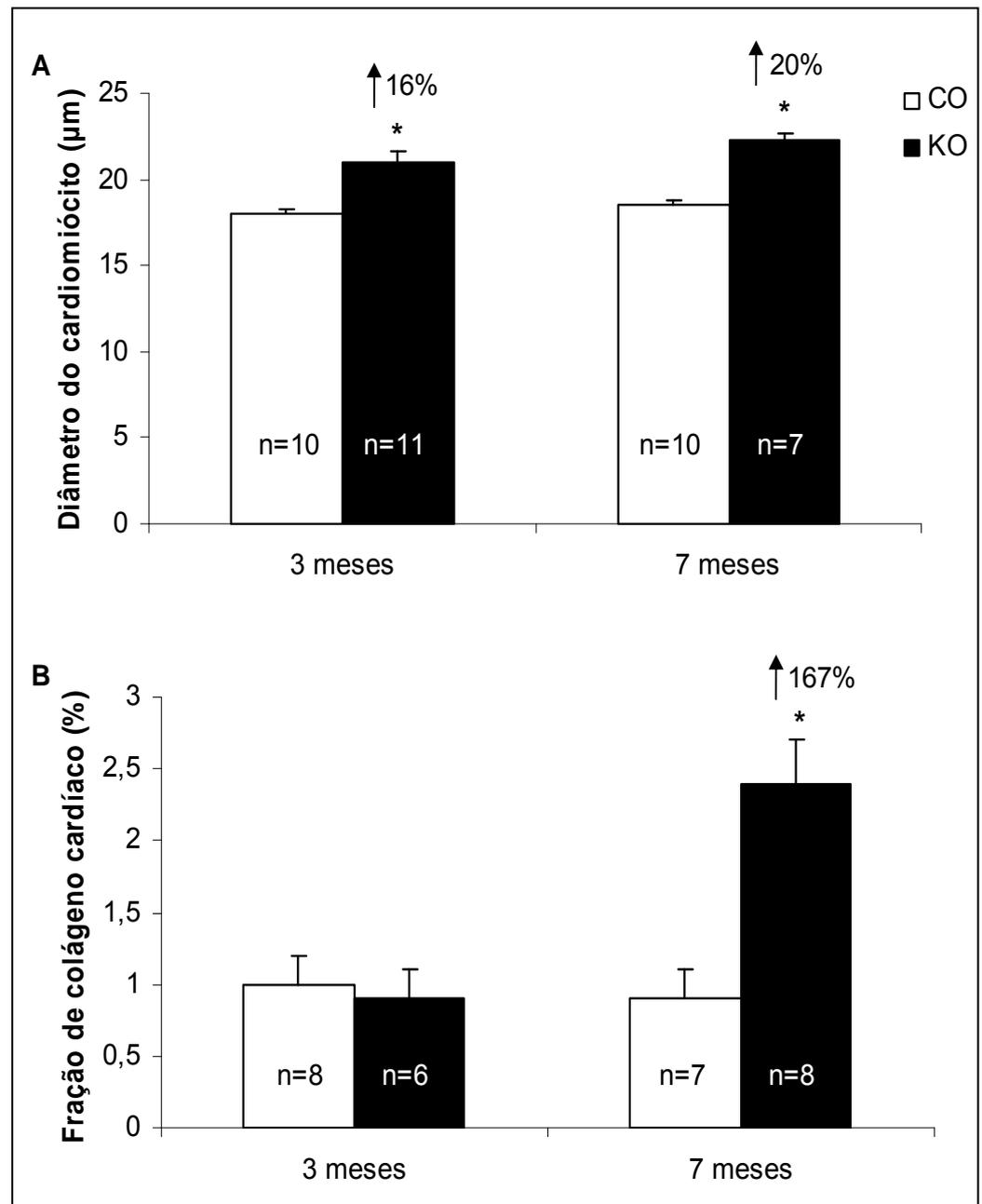
TABELA 3- Peso das câmaras cardíacas corrigido pelo peso corporal dos camundongos controle (CO) e com deleção dos receptores  $\alpha_{2A}$ / $\alpha_{2C}$  adrenérgicos (KO) aos três e sete meses de idade.

	CO		KO	
	3 meses	7 meses	3 meses	7 meses
Átrios (mg/g)	0.3±0.02	0.3±0.01	0.3±0.03	0.2±0.02
VD (mg/g)	0.9 ±0.06	0.9 ±0.03	0.9 ±0.03	0.9 ±0.03
VE (mg/g)	3.2 ±0.1	3.5 ±0.1	3.3 ±0.1	3.3 ±0.1
Coração (mg/g)	4.3 ±0.1	4.5 ±0.2	4.4 ±0.1	4.4 ±0.06
n	14	22	16	10

Os dados foram comparados entre os grupos pela análise de variância de dois fatores (ANOVA).

Após as análises do peso do coração e das câmaras cardíacas, realizamos a medida do diâmetro do cardiomiócito e a quantificação do acúmulo de colágeno cardíaco por microscopia óptica com o intuito de obter maior precisão na avaliação das alterações estruturais cardíacas decorrentes da hiperatividade nervosa simpática.

Conforme pode-se observar na FIGURA 11A, aos três meses de idade os camundongos KO apresentaram um aumento significativo do diâmetro do cardiomiócito quando comparados aos camundongos do grupo controle. Aos sete meses de idade este aumento do diâmetro do cardiomiócito dos camundongos KO foi ainda mais exacerbado. Já em relação à deposição de colágeno cardíaco (FIGURA 11B), observamos que aos três meses de idade os camundongos KO não apresentaram diferença significativa em relação ao grupo controle. Entretanto, aos sete meses de idade os animais KO apresentaram um aumento de 167% na fração de volume de colágeno cardíaco comparados aos animais do grupo controle. Estes dados sugerem que os camundongos KO apresentam um remodelamento cardíaco caracterizado pela hipertrofia dos cardiomiócitos a partir dos três meses de idade e exacerbado acúmulo de colágeno cardíaco aos sete meses de idade. Vale a pena ressaltar que o SRA modula diretamente os mecanismos celulares que resultam no remodelamento cardíaco.



\*diferença significativa vs grupos CO.

& diferença significativa vs. grupos CO 7 meses, CO e KO 3 meses.

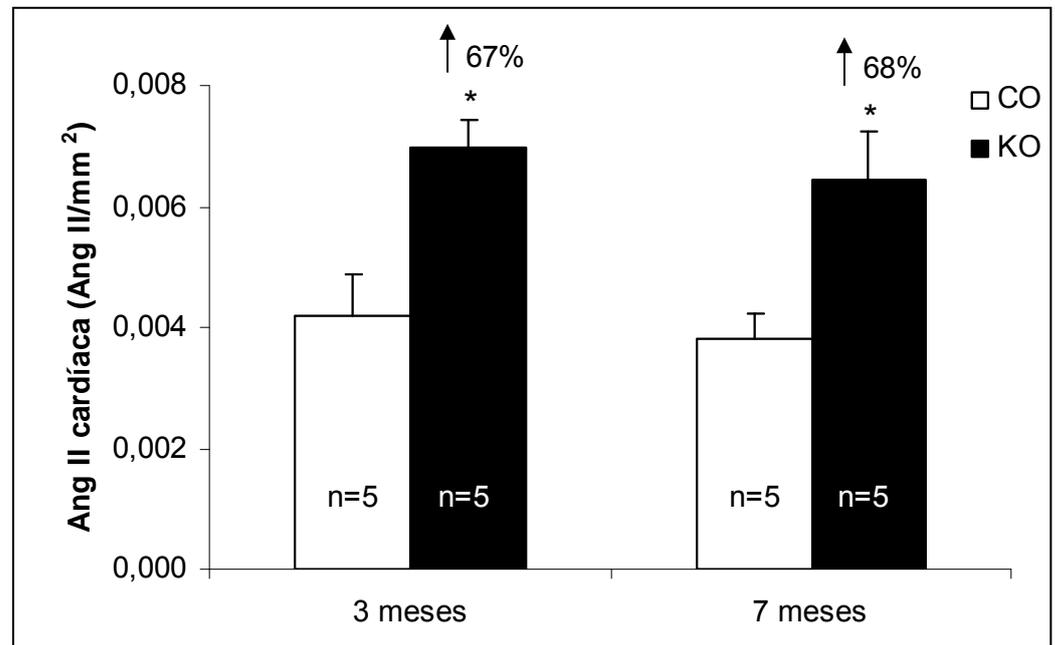
FIGURA 11- Diâmetro do cardiomiócito (A) e fração de colágeno cardíaco (B) de camundongos controle (CO) e com deleção dos receptores  $\alpha_{2A}/\alpha_{2C}$  adrenérgicos (KO) aos três e sete meses de idade. Os dados foram comparados entre os grupos pela análise de variância de dois fatores (ANOVA) com *post-hoc* de Tukey ( $p < 0,05$ ).

## 5.2 Caracterização do sistema renina-angiotensina

### 5.2.1 Quantificação de Ang II cardíaca

Para estudar o efeito da hiperatividade nervosa simpática sobre o sistema renina-angiotensina, primeiramente avaliamos a presença de Ang II no ventrículo esquerdo dos camundongos com deleção dos receptores  $\alpha_{2A}/\alpha_{2C}$  adrenérgicos. Essa avaliação foi realizada pela técnica de imunohistoquímica, sendo utilizada como uma marcação da hiperatividade do SRA local.

Como ilustrado na FIGURA 12, os camundongos KO apresentaram aumento significativo no número de células cardíacas imunorreativas ao anticorpo anti-Ang II quando comparados aos animais do grupo controle nas diferentes faixas etárias estudadas. Aparentemente não houve diferença no número de células marcadas entre os grupos KO de três e sete meses de idade. Estes dados sugerem que os camundongos com hiperatividade nervosa simpática apresentam elevado acúmulo de Ang II cardíaca aos três e sete meses de idade.



\* diferença significativa vs grupos CO.

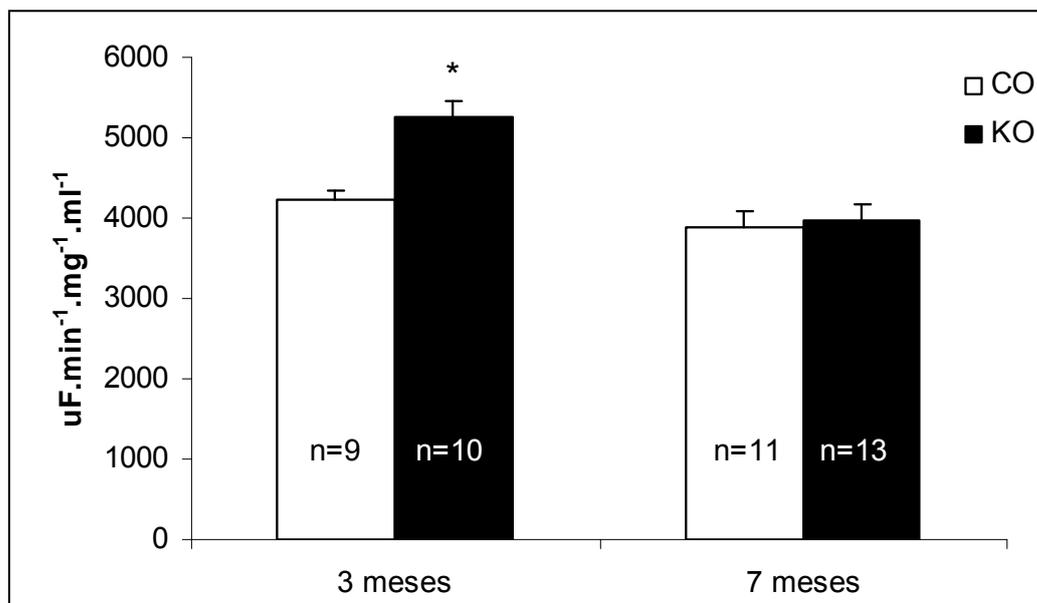
FIGURA 12 - Quantificação de células imunorreativas à Ang II no ventrículo esquerdo de camundongos controle (CO) e com deleção dos receptores  $\alpha_{2A}/\alpha_{2C}$  adrenérgicos (KO) aos três e sete meses de idade. Os dados foram comparados entre os grupos pela análise de variância de dois fatores (ANOVA) com *post-hoc* de Tukey ( $p < 0,05$ ).

### 5.2.2 Atividade da enzima conversora de angiotensina

A atividade da enzima conversora de angiotensina foi dosada em homogeneizado de ventrículo esquerdo, pulmão, rim e soro com o intuito de avaliar a participação sistêmica e tecidual do SRA na cardiomiopatia induzida por hiperatividade simpática.

Como pode-se observar na FIGURA 13, os camundongos KO apresentaram um aumento significativo da atividade da ECA cardíaca aos três meses de idade quando comparados ao grupo controle. Entretanto, aos sete meses de

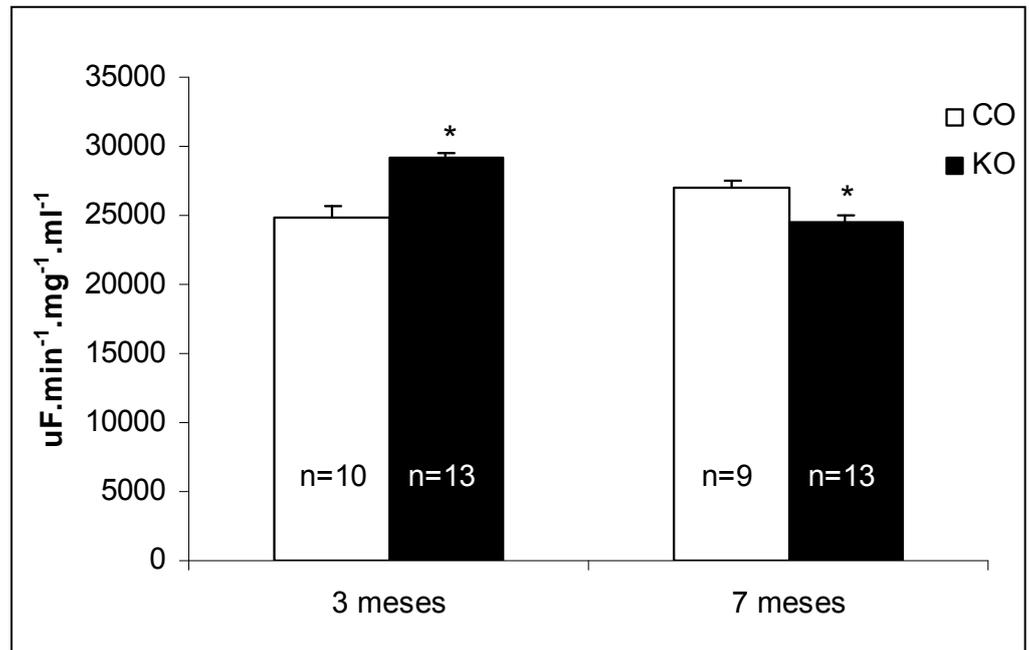
idade observou-se uma significativa redução da atividade da ECA cardíaca nos animais KO, não havendo mais diferença significativa entre os grupos.



\* diferença significativa vs. grupos CO 3 meses, CO e KO 7 meses.

FIGURA 13- Atividade da enzima conversora de Angiotensina (ECA) no coração de camundongos controle (CO) e com deleção dos receptores  $\alpha_{2A}/\alpha_{2C}$  adrenérgicos (KO) aos três e sete meses de idade. Os dados foram comparados entre os grupos pela análise de variância de dois fatores (ANOVA) com *post-hoc* de Tukey ( $p < 0,05$ ).

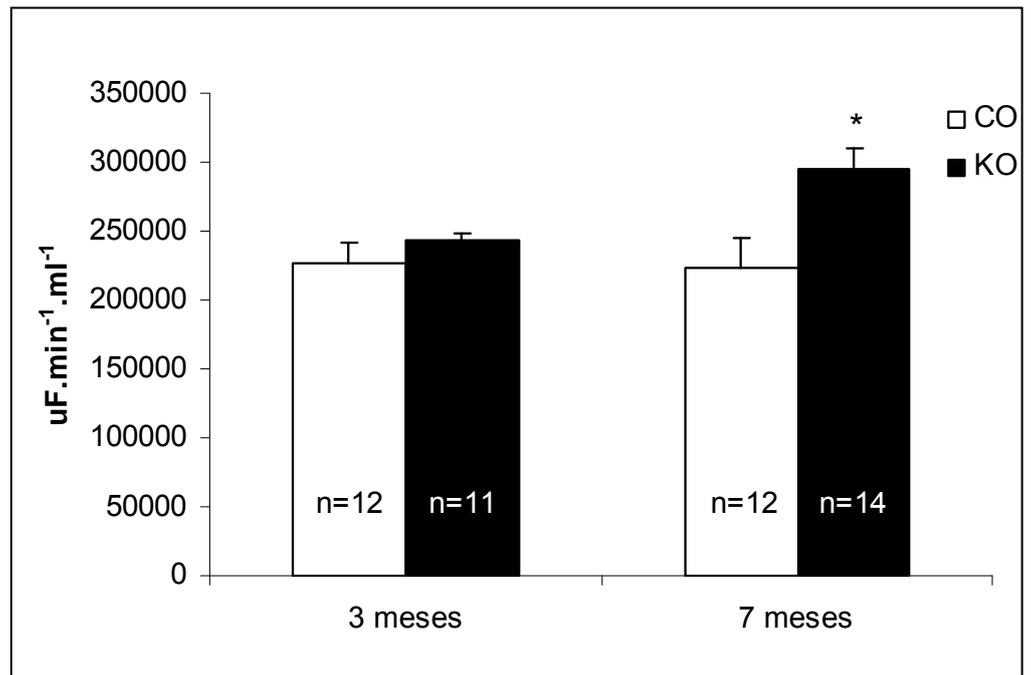
Na FIGURA 14, podemos observar que a atividade da ECA renal dos camundongos KO aos três meses de idade apresentou um comportamento semelhante ao observado no tecido cardíaco, onde verificou-se um aumento significativo da atividade da ECA renal dos camundongos KO. Já aos sete meses de idade, observou-se uma significativa diminuição da atividade da ECA renal nos camundongos do grupo KO em relação ao grupo controle na mesma faixa etária.



\* diferença significativa vs CO na mesma faixa etária.

FIGURA 14- Atividade da enzima conversora de Angiotensina (ECA) nos rins de camundongos controle (CO) e com deleção dos receptores  $\alpha_{2A}$ / $\alpha_{2C}$  adrenérgicos (KO) aos três e sete meses de idade. Os dados foram comparados entre os grupos pela análise de variância de dois fatores (ANOVA) com *post-hoc* de Tukey ( $p < 0,05$ ).

Quando avaliamos a atividade da ECA no soro, observou-se que os camundongos KO não apresentaram diferença significativa da atividade desta enzima em relação ao grupo controle aos três meses de idade (FIGURA 15). Já aos sete meses de idade, constatou-se um aumento acentuado da atividade da ECA circulante nos animais KO. Estes valores foram significativamente diferentes dos valores encontrados nos animais controle aos sete meses de idade.

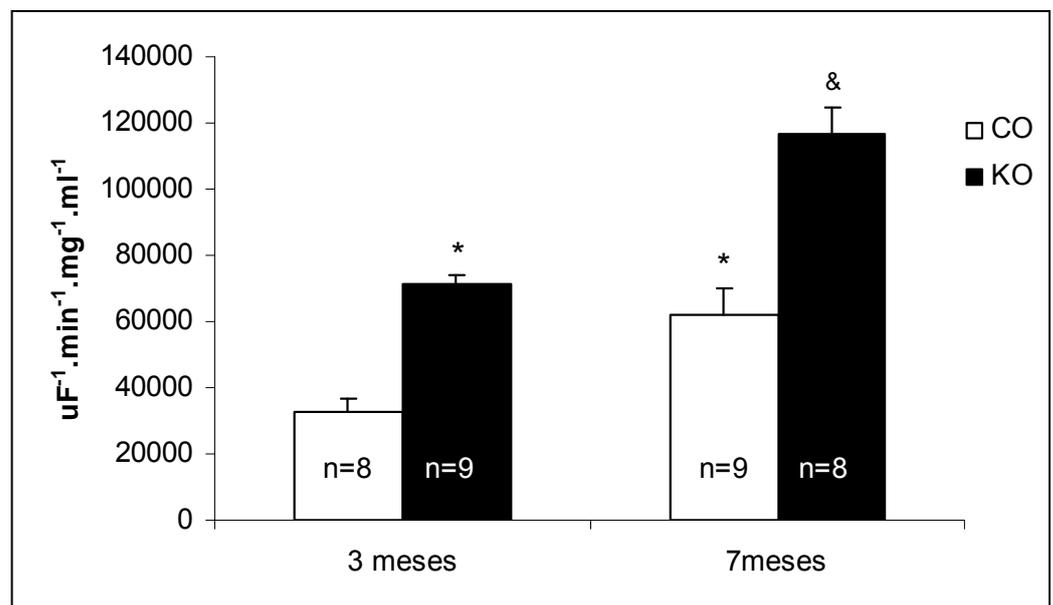


\* diferença significativa vs. grupos CO 7 meses, CO e KO 3 meses.

FIGURA 15- Atividade da enzima conversora de Angiotensina (ECA) no soro de camundongos controle (CO) e com deleção dos receptores  $\alpha_{2A}/\alpha_{2C}$  adrenérgicos (KO) aos três e sete meses de idade. Os dados foram comparados entre os grupos pela análise de variância de dois fatores (ANOVA) com *post-hoc* de Tukey ( $p < 0,05$ ).

Na FIGURA 16, pode-se observar o comportamento da atividade da ECA pulmonar nos animais controle e KO. Interessantemente, os grupos controle e KO aumentaram significativamente a atividade da ECA ao longo do tempo. Contudo, independente da faixa etária, os camundongos KO apresentaram a atividade da ECA pulmonar aumentada em relação ao grupo de camundongos CO na mesma faixa etária.

Com base nestes dados, podemos sugerir que a atividade da ECA dos camundongos com deleção dos receptores  $\alpha_{2A}/\alpha_{2C}$  adrenérgicos é tecido-dependente. Além disso, também constatamos que a atividade da ECA apresenta regulação diferenciada durante a progressão da cardiomiopatia, onde observamos no mesmo tecido, níveis distintos de atividade da ECA quando comparamos camundongos KO com três e sete meses de idade.



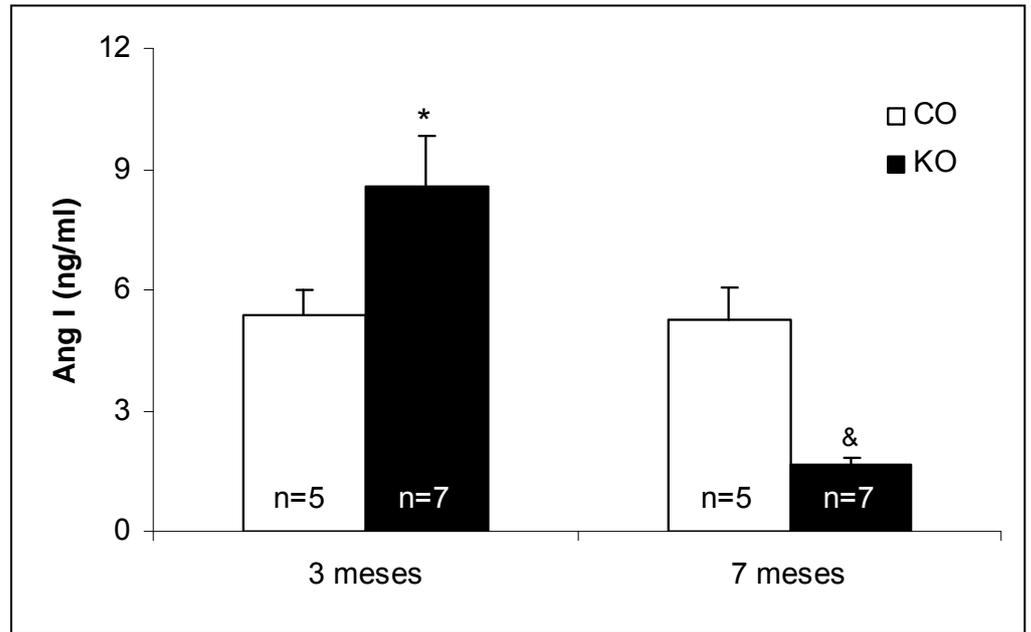
\* diferença significativa vs grupo CO 3 meses.

& diferença significativa vs. grupos CO 7 meses, CO e KO 3 meses.

FIGURA 16- Atividade da enzima conversora de Angiotensina (ECA) nos pulmões de camundongos controle (CO) e com deleção dos receptores  $\alpha_{2A}/\alpha_{2C}$  adrenérgicos (KO) aos três e sete meses de idade. Os dados foram comparados entre os grupos pela análise de variância de dois fatores (ANOVA) com *post-hoc* de Tukey ( $p < 0,05$ ).

### 5.2.3 Atividade da renina plasmática

A atividade da renina foi avaliada no plasma dos camundongos controle e KO aos três e sete meses de idade. Para a realização dessa dosagem foram necessários 150  $\mu$ L de plasma, os quais foram obtidos pelo *pool* de amostras de dois animais. Conforme pode-se observar na FIGURA 17, aos três meses de idade os animais KO apresentaram aumento significativo de 60% na atividade da renina plasmática em relação ao grupo controle. Já aos sete meses de idade, os camundongos KO tiveram uma queda significativa de 70% da atividade quando comparados ao grupo de camundongos controle. Estes dados sugerem que a hiperatividade nervosa simpática modula de forma diferenciada a atividade da renina plasmática nos camundongos com deleção dos receptores  $\alpha_{2A}/\alpha_{2C}$  adrenérgicos aos três e sete meses de idade.



\* diferença significativa vs. grupos CO 3 meses, CO e KO 7 meses.

& diferença significativa vs. grupos CO 7 meses, CO e KO 3 meses.

FIGURA 17- Atividade da renina plasmática em camundongos controle (CO) e com deleção dos receptores  $\alpha_{2A}$ / $\alpha_{2C}$  adrenérgicos (KO) aos três e sete meses de idade. Os dados foram comparados entre os grupos pela análise de variância de dois fatores (ANOVA) com *post-hoc* de Tukey ( $p < 0,05$ ).

#### 5.2.4 Expressão protéica dos receptores de Ang II cardíacos e renina nos rins

Analisamos a expressão protéica dos receptores de Ang II, subtipos AT<sub>1</sub> e AT<sub>2</sub>, nos animais com deleção dos receptores  $\alpha_{2A}/\alpha_{2C}$  adrenérgicos aos três e sete meses de idade com o intuito de avaliar o efeito da hiperatividade nervosa simpática sobre a densidade destes receptores. Conforme ilustrados na FIGURA 18A, houve tendência ( $p=0,09$ ) a aumento da expressão protéica dos receptores de Ang II, subtipo AT<sub>1</sub>, nos camundongos KO em relação os grupo controle aos três meses de idade. Aos sete meses de idade, a expressão destes receptores foi semelhante entre os grupos.

Quando avaliamos a expressão protéica do receptor de Ang II, subtipo AT<sub>2</sub>, não observamos diferença significativa entre os grupos controle e KO nas diferentes faixas etárias estudadas (FIGURA 18B).

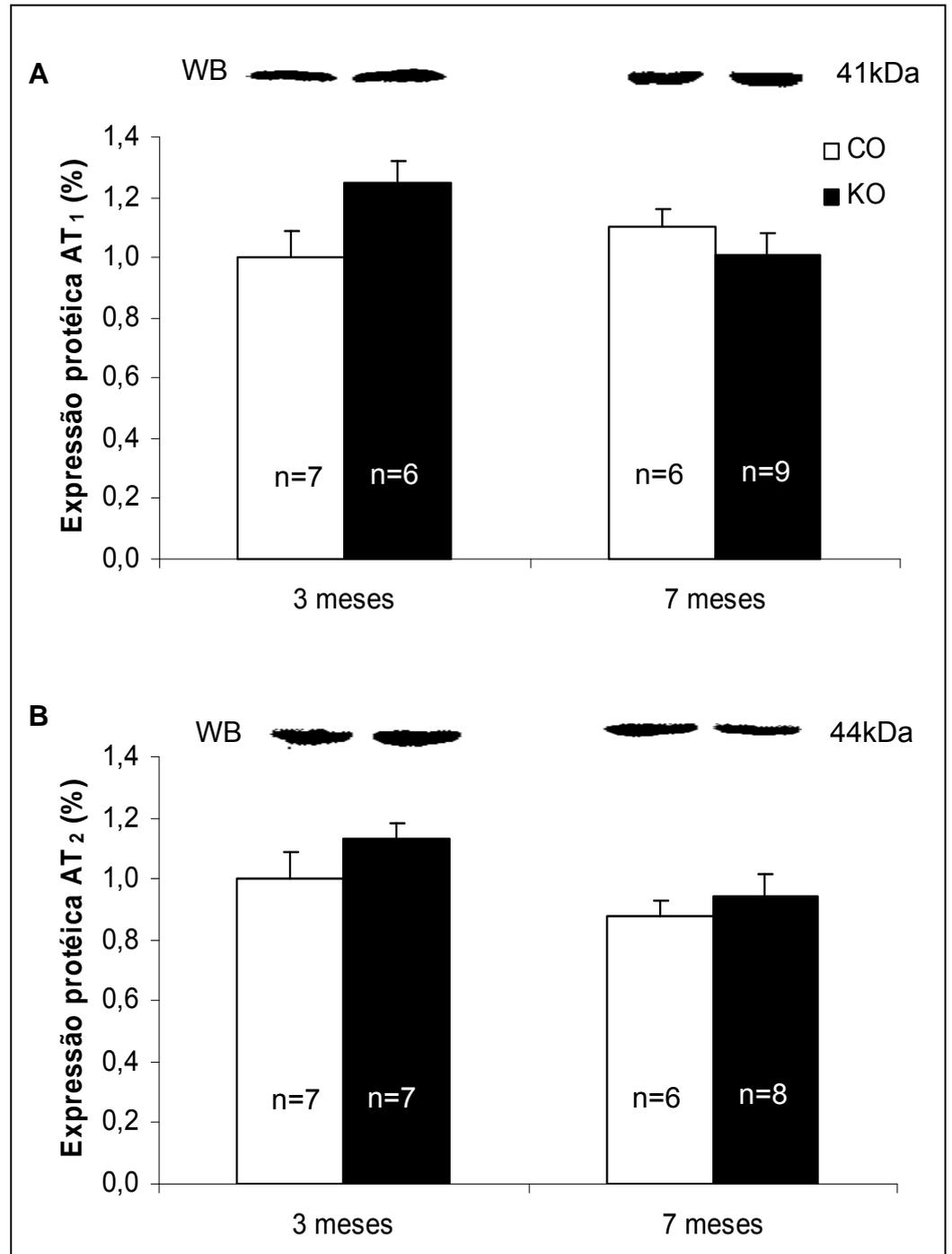
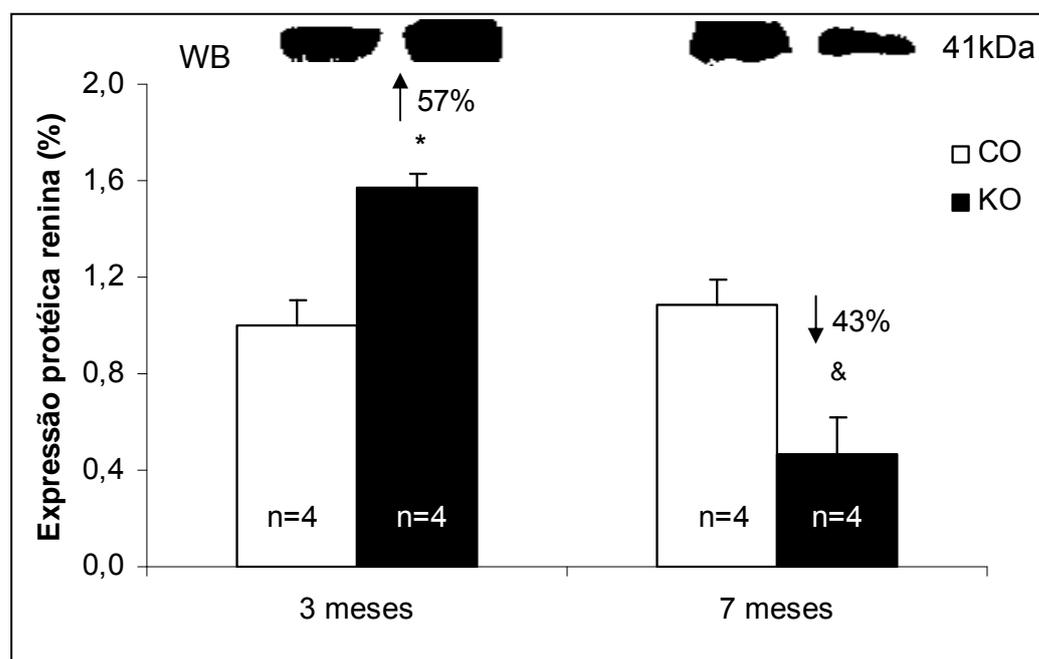


FIGURA 18 - Expressão protéica dos receptores de Angiotensina II, subtipos AT<sub>1</sub> e AT<sub>2</sub>, no coração de camundongos controle (CO) e com deleção dos receptores  $\alpha_{2A}/\alpha_{2C}$  adrenérgicos (KO) aos três e sete meses de idade. Os dados foram comparados entre os grupos pela análise de variância de dois fatores (ANOVA).

Com o objetivo de confirmar os resultados obtidos da atividade da renina plasmática dos camundongos com deleção dos receptores  $\alpha_{2A}/\alpha_{2C}$  adrenérgicos, avaliamos a expressão da renina nos rins dos camundongos controle e KO aos três e sete meses de idade. Conforme ilustrado na FIGURA 19, aos três meses de idade os camundongos KO apresentaram um aumento significativo de 57% na expressão da renina nos rins quando comparados ao grupo controle na mesma faixa etária. Já aos sete meses de idade, observamos que os animais KO apresentaram uma diminuição significativa de 43% na expressão da renina nos rins em relação ao grupo controle e diminuição de 235% em relação ao grupo KO com três meses de idade. Estes dados sugerem que os camundongos KO apresentam alterações na expressão protéica da renina nos rins aos três e sete meses de idade. Além disso, vale a pena ressaltar que a atividade da renina plasmática e a expressão protéica da renina nos rins dos camundongos dos grupos controle e KO apresentaram comportamentos semelhantes aos três e sete meses de idade.



\* diferença significativa vs. grupos CO 3 meses, CO e KO 7 meses.

& diferença significativa vs. grupos CO 7 meses, CO e KO 3 meses.

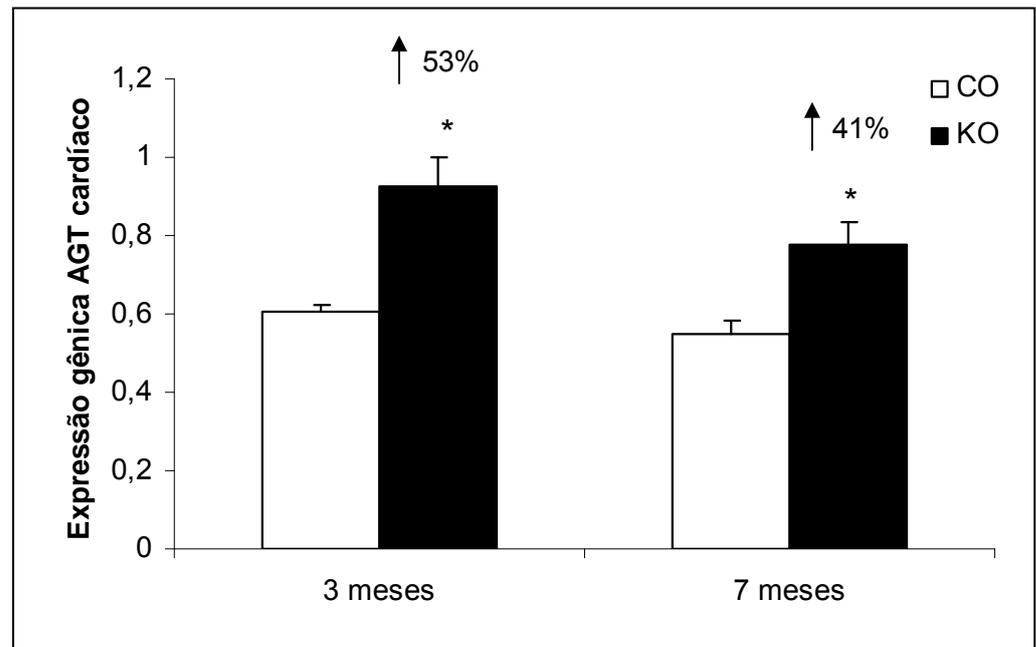
FIGURA 19 - Expressão protéica da renina nos rins dos camundongos controle (CO) e com deleção dos receptores  $\alpha_{2A}/\alpha_{2C}$  adrenérgicos (KO) aos três e sete meses de idade. Os dados foram comparados entre os grupos pela análise de variância de dois fatores (ANOVA) com *post-hoc* de Tukey ( $p < 0,05$ ).

### 5.2.5 Expressão gênica do angiotensinogênio cardíaco

Para estudar o efeito da hiperatividade nervosa simpática sobre o SRA cardíaco, analisamos a expressão gênica do polipeptídeo angiotensinogênio no coração dos camundongos controle e KO aos três e sete meses de idade pelo método de PCR em tempo real.

Conforme pode-se observar na FIGURA 19, aos três meses de idade os camundongos com deleção dos receptores  $\alpha_{2A}/\alpha_{2C}$  adrenérgicos apresentaram um aumento estatisticamente significativo da expressão gênica do angiotensinogênio cardíaco em relação aos camundongos do grupo controle. Além disso, podemos observar que esse aumento manteve-se nos camundongos KO aos sete meses de

idade. Esses dados sugerem que os camundongos KO apresentam expressão elevada do gene para o angiotensinogênio no coração aos três e sete meses de idade.



\* diferença significativa vs grupos CO.

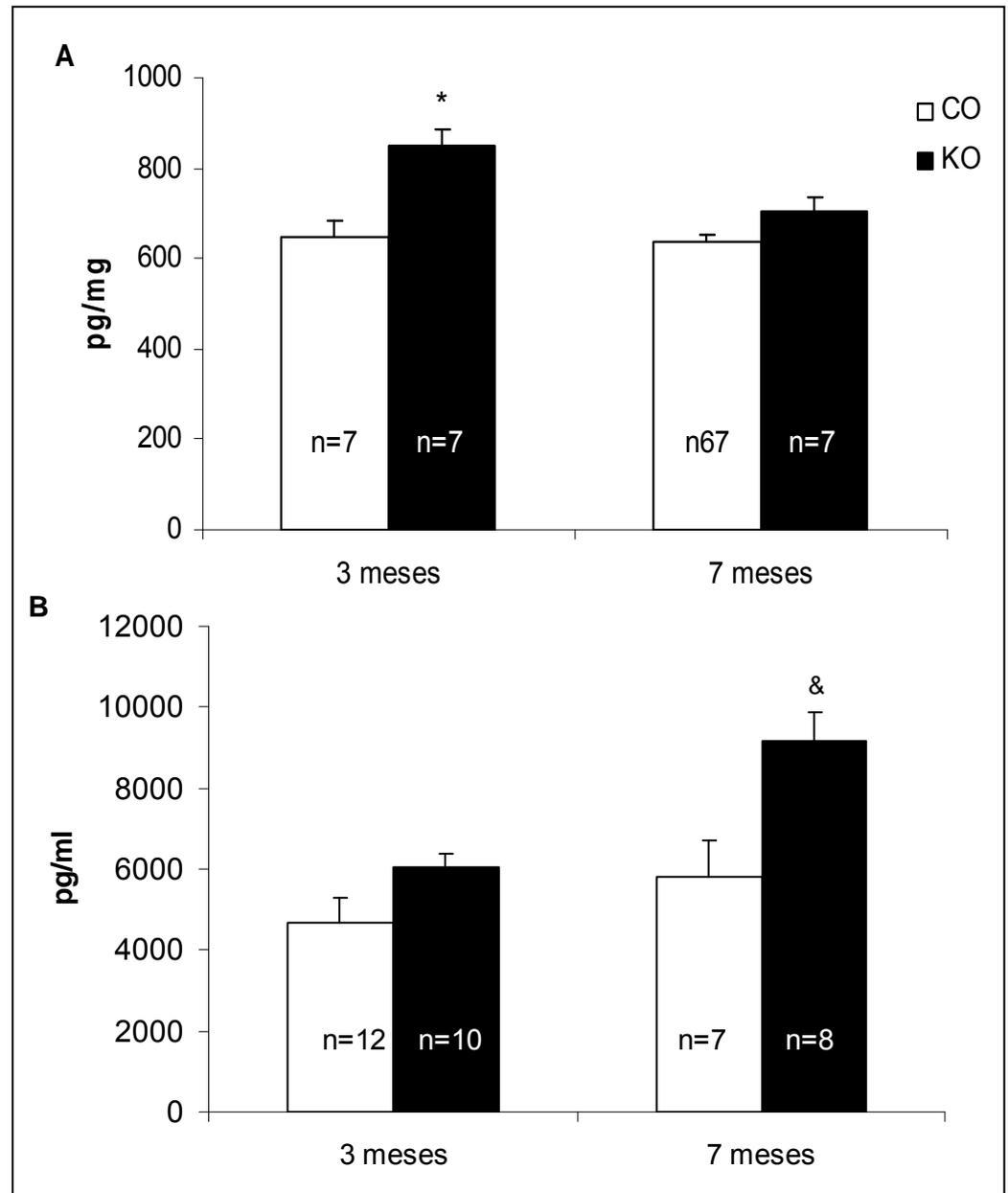
FIGURA 20 - Expressão gênica do angiotensinogênio cardíaco (AGT) cardíaco normalizada pela ciclofilina em camundongos controle (CO) e com deleção dos receptores  $\alpha_{2A}$ / $\alpha_{2C}$  adrenérgicos (KO) aos três e sete meses de idade. Os dados foram comparados entre os grupos pela análise de variância de dois fatores (ANOVA) com *post-hoc* de Tukey ( $p < 0,05$ ).

### 5.2.6 Concentrações de noradrenalina cardíaca e circulante

Para avaliar a hiperatividade nervosa simpática nos camundongos com deleção dos receptores  $\alpha_{2A}/\alpha_{2C}$  adrenérgicos, dosamos as concentrações de noradrenalina no tecido cardíaco e circulante aos três e sete meses de idade.

A FIGURA 20A apresenta os valores das concentrações de noradrenalina cardíaca dos camundongos controle e KO. Conforme pode-se observar, os camundongos KO apresentaram uma aumento significativa das concentrações de noradrenalina cardíaca quando comparados aos camundongos do grupo controle aos três meses de idade. Entretanto, aos sete meses de idade observamos uma diminuição das concentrações de noradrenalina cardíaca nos camundongos KO, onde os valores se aproximaram aos valores de noradrenalina cardíaca do grupo controle.

Quando avaliamos as concentrações de noradrenalina plasmática, constatamos que aos três meses de idade os camundongos KO apresentaram uma tendência em elevação das concentrações de noradrenalina plasmática quando comparados aos camundongos do grupo controle, entretanto os valores não foram estatisticamente significantes (FIGURA 20B). Já aos sete meses de idade, os animais com deleção dos receptores  $\alpha_{2A}/\alpha_{2C}$  adrenérgicos apresentaram elevação significativa na concentração de noradrenalina plasmática em relação aos animais do grupo controle (FIGURA 20B). Esses dados sugerem que os camundongos com deleção dos receptores  $\alpha_{2A}/\alpha_{2C}$  adrenérgicos apresentam diferentes concentrações de noradrenalina cardíaca e circulante aos três e sete meses de idade.



\* diferença significativa vs. grupos CO 3 meses, CO e KO 7 meses.

& diferença significativa vs. grupos CO 7 meses, CO e KO 3 meses.

FIGURA 21- Concentrações de noradrenalina cardíaca (A) e plasmática (B) de camundongos controle (CO) e com deleção dos receptores  $\alpha_{2A}$ / $\alpha_{2C}$  adrenérgicos (KO) aos três e sete meses de idade. Os dados foram comparados entre os grupos pela análise de variância de dois fatores (ANOVA) com *post-hoc* de Tukey ( $p < 0,05$ ).

## 6 DISCUSSÃO

Os resultados deste trabalho mostram pela primeira vez de maneira direta a influência da hiperatividade nervosa simpática crônica na ativação do sistema renina-angiotensina cardíaco.

De acordo com a hipótese formulada, camundongos com deleção dos receptores  $\alpha_{2A}/\alpha_{2C}$  adrenérgicos demonstraram hiperativação do SRA cardíaco nas diferentes fases da progressão da cardiomiopatia induzida por hiperatividade nervosa simpática. Estes resultados sugerem que além dos efeitos cardiotoxícos, a noradrenalina é capaz de ativar o SRA cardíaco e contribuir para o agravamento da cardiomiopatia induzida pela hiperatividade nervosa simpática. Além disso, os resultados encontrados neste trabalho sugerem que a regulação do SRA cardíaco ocorre de maneira diferenciada na progressão da cardiomiopatia induzida por hiperatividade nervosa simpática, uma vez que os camundongos KO apresentaram resultados diferentes da expressão do angiotensinogênio cardíaco, atividade da ECA cardíaca, expressão protéica da renina nos rins e atividade da renina plasmática aos três e sete meses de idade.

### 6.1 Caracterização fenotípica dos camundongos com deleção dos receptores $\alpha_{2A}/\alpha_{2C}$ adrenérgicos

A caracterização fenotípica dos camundongos com deleção dos receptores  $\alpha_{2A}$  e  $\alpha_{2C}$ -adrenérgicos precedeu a quantificação dos componentes do SRA, com o intuito de melhor avaliar a progressão da cardiomiopatia nesse modelo genético de hiperatividade nervosa simpática.

### 6.1.1 Tolerância ao esforço físico

A tolerância ao esforço físico pode ser definida como a quantidade máxima de exercício físico realizado num teste progressivo até a exaustão. A capacidade de realização de exercício físico pode ser quantificada por parâmetros obtidos no teste progressivo até a exaustão como a velocidade final atingida no teste ou a distância total percorrida no teste (BERNSTEIN, 2003). No presente estudo, os camundongos nas faixas etárias de três e sete meses de idade foram submetidos ao protocolo de teste progressivo escalonado até a exaustão em esteira rolante com o objetivo de avaliar a tolerância à realização de esforço físico.

Conforme observado nos resultados apresentados, os animais KO apresentaram uma diminuição da distância total percorrida no teste progressivo até a exaustão apenas aos sete meses de idade, sugerindo que nesta faixa etária os animais KO apresentam intolerância à realização de esforço físico. Este resultado corrobora os dados do laboratório referentes à tolerância a realização de esforço (Rolim et al., 2006).

Um dos marcadores da IC é a intolerância à realização de esforço, definida como redução da capacidade de realização de exercício físico (RUBIM, DRUMOND NETO, ROMEO & MONTERA, 2006). Esta redução dá-se devido à diminuição do consumo de oxigênio pico, caracterizado pela dificuldade da bomba cardíaca em manter o débito necessário para a perfusão tecidual e pela diminuição na diferença artério-venosa de oxigênio na musculatura esquelética, principalmente em exercício físico de intensidades mais elevadas (ROVEDA et al., 2003).

Dentre os fatores relacionados à redução do débito cardíaco durante o exercício físico estão: 1. Fatores funcionais: diminuição da fração de ejeção ventricular, declínio da velocidade de encurtamento circunferencial das fibras, déficit de relaxamento do ventrículo na diástole e diminuição da complacência ventricular; e 2. Fatores estruturais: hipertrofia ventricular descompensada e acúmulo de tecido fibroso (BLANCHET, DUCHARME, RACINE, ROULEAU, TARDIF, JUNEAU, MARQUIS, LARIVÉE, NIGAM, FORTIER & WHITE, 2003). Dessa forma, o teste de esforço é comumente utilizado para diagnóstico ou prognóstico de doenças cardiovasculares, já que algumas anormalidades cardíacas são aparentes somente

após a realização de um protocolo de exercício físico progressivo até a exaustão (GRIGIONI, RUSSO, POTENA, IELASI, FABBRI, BACCHI-REGGIANI, CARIGI, MUSURACA, BIGLIARDI, COCCOLO, MAGNANI, SPECCHIA, MAGELLI & BRANZI, 2006).

Conforme descrito acima, as alterações periféricas que levam à diminuição da diferença artério-venosa de oxigênio na musculatura esquelética também são fatores que podem levar à intolerância ao esforço físico. Dentre os fatores relacionados à diminuição na diferença artério-venosa de oxigênio na musculatura esquelética estão: 1. Fatores funcionais: prejuízo na atividade de enzimas-chave do metabolismo oxidativo das fibras musculares e aumento da expressão de fatores pró-inflamatórios na musculatura esquelética (LUNDE, SJAASTAD, SCHIOTZ THORUD & SEJERSTED, 2001); e 2. Fatores estruturais: diminuição na capilarização muscular, atrofia muscular e mudança do tipo de fibras musculares, onde há transição de fibras musculares com metabolismo predominante oxidativo (fibras musculares tipo I) para fibras musculares com metabolismo glicolítico (fibras musculares tipo IIa e IIb) (LUNDE et al., 2001).

Avaliações estruturais da musculatura esquelética dos camundongos com deleção dos receptores  $\alpha_{2A}$  e  $\alpha_{2C}$ -adrenérgicos realizadas em nosso laboratório por meio da técnica de histoquímica para ATPase miosínica demonstraram que os camundongos KO aos sete meses de idade apresentaram atrofia muscular, transição de fibras do tipo I para fibras do tipo II e rarefação capilar. Mais recentemente observamos também que a transição no tipo de fibra muscular é acompanhada por mudança no perfil metabólico com aumento na atividade da enzima hexoquinase e diminuição da enzima citrato sintase (Bacurau et al., 2006). Atualmente não está bem esclarecido na literatura se as alterações funcionais e estruturais da musculatura esquelética são decorrentes da IC ou são decorrentes da inatividade física apresentada por pacientes com IC (PIEPOLI, KACZMAREK, FRANCIS, DAVIES, RAUCHHAUS, JANKOWSKA, ANKER, CAPUCCI, BANASIAK & PONIKOWSKI, 2006).

Por fim, em nosso modelo a intolerância ao esforço físico parece estar associada tanto a fatores centrais como redução na fração de ejeção cardíaca; quanto a fatores periféricos como alterações estruturais na musculatura esquelética.

### 6.1.2 Medidas cardiovasculares

Quando avaliamos a pressão arterial dos camundongos com deleção dos receptores  $\alpha_{2A}$  e  $\alpha_{2C}$ -adrenérgicos aos três e sete meses de idade pelo método indireto de pletismografia de cauda não observamos diferença significativa entre os grupos controle e KO. De acordo com as respostas vasomotoras desencadeadas pela hiperatividade nervosa simpática, poderíamos esperar que os animais KO apresentassem aumento da pressão arterial, uma vez que a noradrenalina quando ligada aos receptores  $\alpha$ -adrenérgicos presentes nos vasos promove vasoconstrição e aumento da pressão arterial (BLANKESTIJN, 2004). Entretanto não observamos esta resposta nos camundongos KO. Temos uma hipótese que tenta explicar esta inalteração da pressão arterial dos animais KO. A pressão arterial é uma variável hemodinâmica dependente do débito cardíaco e da resistência vascular periférica. Provavelmente os camundongos KO apresentam aumento da resistência vascular periférica decorrente da hiperatividade nervosa simpática. Entretanto, estes camundongos também apresentam uma redução importante da fração de encurtamento do ventrículo esquerdo e possivelmente esta diminuição reflete uma queda do débito cardíaco. Sendo assim, os camundongos KO apresentam um contrabalanço entre a resistência vascular periférica aumentada e o débito cardíaco diminuído, refletindo na inalteração da pressão arterial. É importante ressaltar que esses animais não desenvolvem hipertensão arterial mesmo na presença de hiperatividade nervosa simpática, o que já foi anteriormente demonstrado para esses animais (BRUM et al., 2002).

A frequência cardíaca dos camundongos controle e KO aos três e sete meses de idade foi avaliada pelo intervalo de pulso de pressão arterial obtida pelo método indireto de pletismografia de cauda. Conforme apresentado nos resultados, os camundongos com deleção dos receptores  $\alpha_{2A}$  e  $\alpha_{2C}$ -adrenérgicos apresentaram frequência cardíaca elevada aos três e sete meses de idade. Essa taquicardia é característica neste modelo de cardiomiopatia induzida por hiperatividade do sistema

nervoso simpático, uma vez que existe uma hiper-estimulação dos receptores  $\beta_1$  – adrenérgicos cardíacos. Esses dados corroboram os dados de BRUM et al. (2002).

Hoje em dia é clássica a descrição da hiperatividade do SNS na IC. O nível plasmático de noradrenalina reflete a atividade do SNS (KAYE & ESLER, 2005) e está bastante elevado em portadores de IC, e apresenta relação direta à gravidade clínica da doença. Importante ressaltar que essa hiperatividade do SNS precede e prediz o desenvolvimento da IC, mesmo em pacientes com disfunção ventricular assintomática (PACKER, 1988), e sabe-se que uma das respostas desencadeadas pela hiperatividade nervosa simpática é a taquicardia de repouso (DE MATOS, GARDENGHI, RONDON, SOUFEN, TIRONE, BARRETTO, BRUM, MIDDLEKAUFF & NEGRAO, 2004). A taquicardia basal é reconhecidamente um dos maiores fatores de risco que contribuem para o desenvolvimento de doenças cardiovasculares (PALATINI, BENETOS & JULIUS, 2006; PALATINI & JULIUS, 1999).

Uma vez que a frequência cardíaca influencia diretamente o trabalho cardíaco, a taquicardia de repouso apresentada por pacientes com IC (PALATINI & JULIUS, 2004) e pelos camundongos KO resulta em trabalho cardíaco basal aumentado e, conseqüentemente, maior demanda metabólica, elevação na taxa de consumo de oxigênio pelo miocárdio e aumento na produção de espécies reativas de oxigênio (SHEERAN & PEPE, 2006; TSUTSUI, IDE & KINUGAWA, 2006). Recentemente foi demonstrado que o aumento das concentrações de adenosina em função da hidrólise do ATP está relacionado com a gravidade da IC (CHIDA, OTANI, KOHZUKI, SAITO, KAGAYA, TAKAI, TAKAHASHI, YAMADA & ZUGUCHI, 2006). O aumento da demanda energética em função do aumento do trabalho cardíaco, além de elevar as concentrações de adenosina também gera aumento de metabólitos que alteram o pH intracelular e aumentam a produção de fosfato inorgânico que exerce ação negativa sobre a força de contração do cardiomiócito e consiste em um importante agente pró-arritmogênico (KATZ, 2003). O aumento na concentração de fosfato inorgânico intracelular também interfere na função de inúmeras enzimas envolvidas na produção de energia, assim como na sensibilidade da troponina C ao cálcio (LIOU & CHANG, 2004).

Além de promover aumento do trabalho cardíaco, a taquicardia é um importante fator desencadeante de arritmias e morte súbita (KATZ, 1986). A hiperativação do SNS acarreta em hiperestimulação dos receptores  $\beta$ -adrenérgicos e, conseqüentemente, aumento das concentrações de AMPc intracelular. O segundo mensageiro AMPc é um importante agente arritmogênico (KATZ, 1986). O tratamento farmacológico de pacientes que apresentam taquicardia ventricular não sustentada demonstrou que o tratamento com  $\beta$ -bloqueadores com efeito vasodilatador (BONET, AGUSTI, ARNAU, VIDAL, DIOGENE, GALVE & LAPORTE, 2000) e agentes anti-arritmogênicos como quinidina e procainamida (BIGGER JUNIOR, 1987) foram extremamente eficazes em diminuir a freqüência de arritmias e aumentar a sobrevivência dos pacientes.

Dados do nosso laboratório demonstraram que os camundongos com deleção dos receptores  $\alpha_{2A}$  e  $\alpha_{2C}$ -adrenérgicos apresentaram focos de arritmias em repouso e durante exercício físico em intensidades submáximas (dados não publicados).

### 6.1.3 Medidas ecocardiográficas

Atualmente, a utilização do exame ecocardiográfico na avaliação morfofuncional cardíaca é extremamente recomendada para fins de prognóstico e como indicadores de progressão da IC (FRIGERIO & ROUBINA, 2005). Os parâmetros funcionais fração de encurtamento e fração de ejeção; e os parâmetros estruturais diâmetro ventricular esquerdo, espessura do septo intraventricular e espessura da parede posterior do ventrículo esquerdo observados na avaliação ecocardiográfica são as medidas mais utilizadas no diagnóstico da IC em humanos (DE SIMONE & PALMIERI, 2002; WANG, YIP, WANG, ZHANG, HO, TSE, YU & SANDERSON, 2005). Além disso, esses parâmetros também são utilizados na detecção de alterações morfofuncionais cardíacas de camundongos (NIENABER et al., 2003; SANTOS et al., 2006).

É consenso na literatura que a hiperatividade nervosa simpática, quando ativada cronicamente, acarreta em remodelamento cardíaco acompanhado pela

disfunção ventricular esquerda (BRUM et al., 2006). Dessa forma, para avaliar as alterações morfofuncionais cardíacas decorrentes da hiperatividade nervosa simpática nos camundongos com deleção dos receptores  $\alpha_{2A}$  e  $\alpha_{2C}$ -adrenérgicos realizamos ecocardiograma aos três e sete meses de idade. Conforme observado nos resultados, aos três meses de idade os camundongos KO apresentaram ligeira diminuição da função sistólica, caracterizada pela diminuição da fração de encurtamento e da fração de ejeção. Aos sete meses de idade constatamos um agravamento da disfunção ventricular acompanhado pela dilatação do ventrículo esquerdo. Esses resultados sugerem que os camundongos KO apresentam uma progressão da disfunção ventricular ao longo do tempo. Portanto, pudemos constatar que aos sete meses de idade os animais KO apresentam sinais clínicos de IC como a dilatação ventricular esquerda acompanhada de disfunção contrátil.

A disfunção ventricular esquerda observada nestes camundongos com hiperatividade do SNS é consequência da ativação recíproca dos sistema nervoso simpático e sistema renina-angiotensina. Dentre os mecanismos fisiológicos e celulares envolvidos na deterioração da função cardíaca na hiperatividade simpática estão a diminuição da expressão dos receptores  $\beta_1$ -adrenérgicos cardíacos desencadeada pela exacerbada liberação de noradrenalina no terminal nervoso simpático cardíaco (BRISTOW, 1993) e a facilitação da formação de Ang II desencadeada pelo aumento da liberação de renina pelas células justaglomerulares renais (GOODMAN & GILMAN, 2003). Esses mecanismos contribuem de maneira significativa para o agravamento da disfunção ventricular e o remodelamento cardíaco.

A melhora da função ventricular esquerda em pacientes portadores de IC com atividade nervosa simpática elevada é observada após o tratamento da síndrome com agentes farmacológicos capazes de minimizar a atividade dos SNS e SRA, uma vez que esses sistemas estão diretamente interligados e contribuem para o agravamento da síndrome e aumento da mortalidade de pacientes portadores de IC (GUYATT & DEVEREAUX, 2004). Atualmente, estima-se que pacientes nas classes funcionais II, III, IV da *New York Heart Association* (NYHA) apresentam no período de um ano taxa de mortalidade de 10%, 20% e 40%, respectivamente

(GUYATT & DEVEREAUX, 2004), e o tratamento destes pacientes com inibidores da ECA, antagonistas dos receptores de Ang II, subtipo AT<sub>1</sub>, e diferentes gerações de  $\beta$ -bloqueadores são capazes de diminuir em 50% e 30% a taxa de mortalidade e a frequência de internação destes pacientes, respectivamente (GUYATT & DEVEREAUX, 2004).

Estudos prévios realizados em nosso laboratório mostraram que camundongos KO tratados com monoterapias losartan 10 mg/kg/dia (antagonista do receptor de Ang II, subtipo AT<sub>1</sub>), metoprolol 165 mg/kg/dia ( $\beta$ -bloqueador de segunda geração) e o tratamento combinado losartan mais metoprolol nas doses descritas acima apresentaram melhora da função ventricular esquerda quando comparados aos camundongos KO não tratados na mesma faixa etária. Os tratamentos foram realizados diariamente a partir do quinto mês de idade, durante oito semanas (dados não mostrados).

As análises ecocardiográficas realizadas em nosso estudo tiveram como limitação a impossibilidade da avaliação da função diastólica dos camundongos controle e KO, uma vez que a elevada frequência cardíaca apresentada pelos camundongos, mesmo sobre efeito da anestesia, promoveu a sobreposição das ondas E (enchimento rápido do ventrículo) e A (enchimento lento do ventrículo); e a medida do tempo de relaxamento isovolumétrico não foi sensível o suficiente para detectar diferença entre os grupos estudados.

#### 6.1.4 Massa corporal e peso dos órgãos

Conforme demonstrado na seção de resultados, os camundongos KO apresentaram redução do peso corporal aos três meses de idade e redução do peso da gordura retroperitoneal aos três e sete meses de idade. Provavelmente, essa diminuição do peso corporal e do peso da gordura retroperitoneal observada nos camundongos KO ocorreu em decorrência da hiperatividade nervosa simpática, uma vez que o tecido adiposo apresenta alta densidade de receptores  $\beta$ -adrenérgicos, e quando ativados, resultam numa atividade lipolítica aumentada (BOWERS, GETTYS, PRPIC, HARRIS & BARTNESS, 2005). Além da perda de massa gorda observada

nos resultados, este modelo animal de cardiomiopatia induzida por hiperatividade simpática também apresentou perda de massa muscular aos sete meses de idade, caracterizada pela atrofia muscular (dados não publicados). Esses dados foram observados por uma aluna do laboratório que caracterizou o fenótipo da musculatura esquelética dos camundongos KO aos três e sete meses de idade. O comportamento de perda de massa muscular apresentado pelos camundongos KO aos sete meses de idade é semelhante ao comportamento de perda de massa muscular de humanos portadores de IC classes funcionais III e IV (NICOLETTI, CICOIRA, ZANOLLA, FRANCESCHINI, BRIGHETTI, PILATI & ZARDINI, 2003).

Com o intuito de averiguar sinais clínicos de IC nos camundongos KO, avaliamos o peso úmido dos pulmões dos animais nas diferentes faixas etárias. Entretanto, conforme apresentado nos resultados, não observamos diferença significativa entre os grupos aos três e sete meses de idade. Porém, quando analisamos o teor de água nos pulmões por meio do cálculo da razão peso úmido/peso seco dos pulmões observamos que aos sete meses de idade, a razão peso úmido/peso seco do pulmão aumentou 65% nos camundongos KO quando comparados ao grupo controle. Esses dados sugerem que os camundongos KO apresentam edema pulmonar aos sete meses de idade.

A formação de edema pulmonar é um sinal clássico de IC tanto em humanos quanto em modelos experimentais (NISHI, KAWANO, MISAKI, HOSHI, MASUMI, IIDA, WATANABE & YAMAGUCHI, 2006; REMO, 2005), pois reflete a incapacidade do ventrículo esquerdo em bombear sangue devido ao prejuízo da função contrátil cardíaca (FIGUEROA & PETERS, 2006). Como consequência, o que se observa é um aumento do volume sistólico final, regurgitação de sangue para o átrio esquerdo e, conseqüentemente, acúmulo de líquido nos pulmões.

Além destes sinais clínicos, avaliamos o efeito da hiperatividade nervosa simpática em órgãos-alvo como o rim, uma vez que cronicamente a hiperatividade do sistema nervoso simpático renal acarreta na insuficiência renal, como observada em pacientes hipertensos (BOERO, PIGNATARO, FERRO & QUARELLO, 2001). Para isso, analisamos o peso úmido dos rins dos camundongos KO aos três e sete meses de idade. Conforme demonstrado nos resultados, os camundongos KO apresentaram

aumento do peso úmido dos rins somente aos sete meses de idade. Como os camundongos com deleção dos receptores  $\alpha_{2A}$  e  $\alpha_{2C}$ -adrenérgicos apresentam atividade nervosa simpática elevada, acreditamos que cronicamente essa hiperativação pode levar a alterações funcionais nos rins, levando em último caso ao aumento do peso dos rins e insuficiência renal. Este modelo pode ser similar ao modelo de hipertensão arterial de dois rins um clipe, onde a diminuição da perfusão sanguínea renal para o rim com clipe acarreta em exacerbada liberação de renina, formação de Ang II e hipertrofia do rim (XIE, SUN, YANG & SUN, 2006).

SAUZEAU, SEVILLA, RIVAS-ELENA, DE ALAVA, MONTERO, LOPEZ-NOVOA e BUSTELO (2006), utilizando um modelo de camundongos com ablação do proto-oncogene Vav3, observaram que esses animais apresentavam hiperatividade nervosa simpática crônica similar aos camundongos com deleção dos receptores  $\alpha_{2A}$  e  $\alpha_{2C}$ -adrenérgicos. Entretanto, os autores desconhecem o mecanismo que leva os camundongos a desenvolver a hiperatividade nervosa simpática. Interessantemente, esses camundongos que desenvolvem hiperatividade nervosa simpática a partir do nascimento apresentaram aos quatro meses de idade sinais de insuficiência renal como: diminuição do volume urinário, do *clearance* de creatinina, e da excreção de  $\text{Na}^+$  e  $\text{Cl}^-$ . Além disso, esses animais apresentaram acúmulo de colágeno nos rins. Vale a pena ressaltar que o tratamento com o  $\beta$ - bloqueador de primeira geração propranolol durante cinco semanas restaurou a função renal.

Os rins são órgãos imprescindíveis na manutenção da função cardíaca, regulando o volume sanguíneo circulante e a formação de Ang II. Na IC, a hiperatividade simpática renal leva à retenção hídrica e síntese de renina pelos rins, o que culmina em aumento da sobrecarga volumétrica cardíaca e aumento da concentração da renina circulante, respectivamente. RUNDQVIST, ELAM, EISENHOFER e FRIBERG (1996) demonstraram que pacientes portadores de IC, após o transplante cardíaco, apresentaram redução na atividade nervosa simpática renal acompanhada pela diminuição da retenção hídrica pelos rins e menor síntese de renina. Esses dados sugerem que a hiperatividade nervosa simpática renal contribui para o agravamento da disfunção cardíaca. Sendo assim, concluímos que a hiperatividade nervosa simpática cronicamente promove alterações funcionais e

estruturais nos rins de humanos e roedores, o que culmina em sobrecarga hemodinâmica, exacerbação da atividade do SRA, remodelamento cardíaco e agravamento da disfunção ventricular.

#### 6.1.5 Análise morfométrica cardíaca

A alteração estrutural cardíaca é consequência direta de estímulos mecânicos e neuro-humorais sobre o coração (KATZ, 2003). Atualmente, o remodelamento cardíaco é caracterizado por três diferentes tipos de crescimentos cardíacos: 1. crescimento normal, decorrente do desenvolvimento dos indivíduos; 2. crescimento fisiológico, desencadeado por fatores ambientais como o exercício físico; e 3. crescimento patológico, desencadeado por estímulos patológicos como a hiperatividade neuro-humoral (DORN 2ND & FORCE, 2005). Durante a progressão da IC, a hiperatividade dos sistemas neuro-humorais e o aumento do estresse mecânico sobre o coração são os principais mecanismos que levam ao desenvolvimento da hipertrofia ventricular esquerda (MANN, 2005). O aumento da massa cardíaca na progressão da IC é considerado um dos principais fatores desencadeadores da disfunção ventricular esquerda e atualmente, é descrito como padrão ouro no diagnóstico da IC em humanos (VAN DEN BOSCH, ROBBERS-VISSER, KRENNING, MCGHIE, HELBING, MEIJBOOM & ROOS-HESELINK, 2006), ratos (INAGAKI, IWANAGA, SARAI, ONOZAWA, TAKENAKA, MOCHLY-ROSEN & KIHARA, 2002) e camundongos (SAUZEAU et al., 2006).

Ao avaliarmos a influência da hiperatividade nervosa simpática na morfologia cardíaca dos camundongos com deleção dos receptores  $\alpha_{2A}$  e  $\alpha_{2C}$ -adrenérgicos aos três e sete meses de idade por meio da análise do peso das câmaras cardíacas, medida do diâmetro dos cardiomiócitos e quantificação de colágeno cardíaco, observamos que os camundongos KO não apresentaram diferença significativa no peso das câmaras cardíacas quando comparados ao grupo controle nas diferentes faixas etárias. Entretanto, a morfometria cardíaca revelou que os camundongos KO apresentavam hipertrofia dos cardiomiócitos aos três e sete meses de idade. Em relação à deposição de tecido fibroso no coração, os dados mostraram que aos sete meses de idade os animais KO apresentavam aumento da

fração de volume de colágeno cardíaco. Provavelmente, a perda da complacência ventricular dada pelo acúmulo de colágeno cardíaco somada à hipertrofia do cardiomiócito reflete a grave disfunção ventricular observada nos camundongos KO aos sete meses de idade.

Temos uma hipótese referente ao aumento da secção transversa do cardiomiócito sem alteração no peso do coração dos camundongos com deleção dos receptores  $\alpha_{2A}$  e  $\alpha_{2C}$ -adrenérgicos. A exacerbada liberação de noradrenalina na fenda sináptica cardíaca, desencadeada pela hiperatividade nervosa simpática, cronicamente exerce efeito tóxico sobre o cardiomiócito e acarreta, em última instância, na estimulação de vias intracelulares pró-apoptóticas. BRUM et al. (2002) demonstraram por microscopia eletrônica que camundongos KO apresentavam degradação dos cardiomiócitos e hipertrofia dos remanescentes.

Atualmente, a reversão do remodelamento cardíaco patológico é uma das estratégias mais eficazes em melhorar a função ventricular em pacientes portadores de IC (MAACK, ELTER, NICKENIG, LAROSEE, CRIVARO, STABLEIN, WUTTKE & BOHM, 2001; YOUNG, DUNLAP, PFEFFER, PROBSTFIELD, COHEN-SOLAL, DIETZ, GRANGER, HRADEC, KUCH, MCKELVIE, MCMURRAY, MICHELSON, OLOFSSON, OSTERGREN, HELD, SOLOMON, YUSUF & SWEDBERG, 2004). Dentre as terapias farmacológicas mais utilizadas na regressão da hipertrofia cardíaca estão o tratamento monoterápico (O'MEARA, SOLOMON, MCMURRAY, PFEFFER, YUSUF, MICHELSON, GRANGER, OLOFSSON, YOUNG & SWEDBERG, 2004; YOUNG et al., 2004) e o tratamento combinado (MCKELVIE, ROULEAU, WHITE, AFZAL, YOUNG, MAGGIONI, HELD & YUSUF, 2003; MCKELVIE, YUSUF, PERICAK, AVEZUM, BURNS, PROBSTFIELD, TSUYUKI, WHITE, ROULEAU, LATINI, MAGGIONI, YOUNG & POGUE, 1999) utilizando diferentes classes de medicamentos como: inibidores da ECA, antagonistas do receptor de Ang II, subtipo  $AT_1$ , e bloqueadores dos receptores  $\beta$ -adrenérgicos. Como se pode observar, grande parte dos medicamentos utilizados na regressão do remodelamento ventricular patológico na IC tem como foco principal a inibição dos SNS e SRA. Dados obtidos em nosso laboratório apontam que o tratamento dos

camundongos com deleção dos receptores  $\alpha_{2A}$  e  $\alpha_{2C}$ -adrenérgicos utilizando diferentes gerações de  $\beta$ -bloqueadores foi eficaz em reverter o remodelamento cardíaco patológico, melhorar a função cardíaca e aumentar a taxa de sobrevivência dos camundongos (Bartolomeu et al., 2006).

Até o momento, com base nos dados da descrição fenotípica dos camundongos com deleção dos receptores  $\alpha_{2A}$  e  $\alpha_{2C}$ -adrenérgicos podemos sugerir que estes animais apresentam aos três e sete meses de idade cardiomiopatia induzida por hiperatividade simpática em estágios inicial e avançado, respectivamente. Constatamos que aos três meses de idade os camundongos KO apresentaram taquicardia basal, ligeira diminuição da função sistólica, hipertrofia dos cardiomiócitos e elevada concentração de noradrenalina cardíaca. Já aos sete meses de idade, observamos que os camundongos KO apresentaram intolerância ao esforço físico, agravamento da disfunção sistólica, aumento da retenção hídrica nos pulmões, alteração do peso dos rins, hipertrofia dos cardiomiócitos, acúmulo de colágeno cardíaco e elevada concentração de noradrenalina circulante. Vale a pena ressaltar que nesta fase os animais KO apresentam 50% de mortalidade (BRUM et al., 2002).

## **6.2 Caracterização do sistema renina-angiotensina**

Após a descrição fenotípica dos camundongos com deleção dos receptores  $\alpha_{2A}$  e  $\alpha_{2C}$ -adrenérgicos aos três e sete meses de idade realizamos a caracterização do SRA durante a progressão da cardiomiopatia induzida por hiperatividade simpática.

### **6.2.1 Quantificação de Ang II cardíaca**

A Ang II é o principal peptídeo efetor do SRA e está diretamente envolvida no remodelamento cardíaco maléfico, contribuindo de maneira significativa para a patogênese e progressão da IC (KIM, 2000). Estudos experimentais e clínicos mostraram que a utilização de inibidores da ECA ou antagonistas dos receptores de Ang II, subtipo  $AT_1$ , foram eficazes em reverter o remodelamento cardíaco patológico desenvolvido na progressão da IC (YONEMOCHI et al., 1998; YOUNG et al., 2004).

SADOSHIMA e IZUMO (1993) foram os primeiros a observar que cardiomiócitos de ratos neonatos em cultura tratada com Ang II desenvolviam hipertrofia e aumentavam a expressão gênica de fatores de transcrição (c-fos, c-jun, jun B, c-myb, c-myc), fatores de crescimento (TGF- $\beta$ ) e marcadores de hipertrofia.

Os efeitos tróficos da Ang II no coração são bem conhecidos. Atualmente, a grande questão que paira sobre o SRA é referente à origem do polipeptídeo Ang II que exerce efeitos tróficos sobre miocárdio. Antigamente, acreditava-se que a Ang II circulante era o principal peptídeo que desencadeava o remodelamento cardíaco maléfico observado na IC. Entretanto, nas últimas décadas alguns trabalhos constataram que a Ang II local é quem exerce importante papel nos processos de hipertrofia do cardiomiócito, proliferação de fibroblasto, necrose e apoptose do cardiomiócito (ANVERSA, OLIVETTI & CAPASSO, 1991; CODY, 1997; DZAU & RE, 1994; LIU, LERI, LI, WANG, CHENG, KAJSTURA & ANVERSA, 1998; TAN, JALIL, PICK, JANICKI & WEBER, 1991). Sendo assim, para uma avaliação mais precisa do efeito da hiperatividade nervosa simpática sobre o SRA local, realizamos a quantificação da Ang II no tecido cardíaco nas diferentes fases da cardiomiopatia.

A avaliação das concentrações do octapeptídeo Ang II no coração dos camundongos KO foi o primeiro passo realizado para estudar a atividade do SRA nesse modelo de cardiomiopatia induzida por hiperatividade nervosa simpática. Quantificamos o número de células imunorreativas para a Ang II no ventrículo esquerdo dos animais KO e controle nas diferentes faixas etárias pela técnica de imunohistoquímica. Conforme observado nos resultados, os camundongos com deleção dos receptores  $\alpha_{2A}$  e  $\alpha_{2C}$ -adrenérgicos apresentaram aumento nas concentrações de Ang II cardíaca aos três e sete meses de idade. Esse resultado somado às alterações na ultraestrutura cardíaca sugere que o SRA está hiperativado nesse modelo de cardiomiopatia induzida por hiperatividade simpática.

Após constatar que os camundongos KO apresentavam Ang II elevada no coração, decidimos avaliar quais componentes do SRA (circulante e local) estavam participando na formação da Ang II cardíaca, uma vez que a síntese desse polipeptídeo pode ocorrer de diferentes formas: 1. todos os componentes do SRA podem ser sintetizados *in situ* e permitir a formação de Ang II cardíaca, independente

da circulação; 2. os componentes do SRA podem ser capturados da circulação e a formação de Ang II pode ocorrer na presença desses componentes; 3. as células cardíacas podem expressar todos os componentes do SRA e formar Ang II; e 4. combinação das possibilidades descritas acima (DOSTAL & BAKER, 1999).

Na literatura, os trabalhos que descreveram a interação entre o SNS e o SRA discutiram essencialmente os efeitos do sistema nervoso simpático sobre a liberação de renina e formação de Ang II nos rins. No entanto, pouco se sabe sobre os efeitos da hiperatividade nervosa simpática na produção local de Ang II cardíaca. Recentemente, SAUZEAU et al. (2006) estudaram o SRA em um modelo genético de hiperatividade nervosa simpática. Os autores observaram que a atividade dos componentes do SRA circulante estava aumentada, bem como a Ang II plasmática. Entretanto, os autores não estudaram os componentes do SRA cardíaco. Um dos motivos para a escassez de estudos nessa área é a limitação das técnicas de detecção de Ang II cardíaca (KIM, 2000).

### 6.2.2 Atividade da enzima conversora de angiotensina

A enzima conversora de angiotensina é considerada a principal metaloprotease responsável pela conversão de Ang I em Ang II em roedores (WOLLERT & DREXLER, 1999), uma vez que os roedores apresentam uma forma inativa da quimase (DOSTAL & BAKER, 1999). Antigamente, acreditava-se que a ECA advinda da circulação era a enzima responsável pela clivagem da Ang I. Contudo, nas últimas décadas uma série de trabalhos demonstraram que a ECA cardíaca é a principal enzima responsável pela formação de Ang II cardíaca (FALKENHAHN, FRANKE, BOHLE, ZHU, STAUSS, BACHMANN, DANILOV & UNGER, 1995; SUN, CLEUTJENS, DIAZ-ARIAS & WEBER, 1994). Alguns trabalhos observaram que, além de exercer importante função na formação de Ang II, a ECA cardíaca está hiper-expressa em modelos experimentais de sobrecarga pressórica e IC induzida por ligadura da coronária (FALKENHAHN et al., 1995; SUN et al., 1994).

Atualmente pouco se sabe sobre a influência do SNS sobre a atividade da ECA durante a progressão da cardiomiopatia. XAVIER-NETO, PEREIRA,

JUNQUEIRA, CARMONA e KRIEGER (1999) constataram que células endoteliais de coelhos apresentaram um aumento da atividade da ECA após o tratamento com isoproterenol. Os autores observaram que o isoproterenol estimulava a região promotora da ECA via AMPc e PKA. Vale a pena ressaltar que as células endoteliais cardíacas são as principais células que expressam a ECA. HANSEN, BENDTSEN e HENRIKSEN (1999) observaram que indivíduos normais não alteraram a atividade da ECA circulante após tratamento com  $\beta$ -bloqueador. Entretanto, COHEN SOLAL, JONDEAU, BEAUVAIS e BERDEAUX (2004) constataram que pacientes com IC classes funcionais II e III tratados com carvedilol ( $\beta$ -bloqueador de terceira geração) foram capazes de diminuir a atividade da ECA circulante e melhorar a função cardíaca. Na tentativa de obter maiores informações em relação ao efeito da atividade nervosa simpática sobre a atividade da ECA cardíaca, analisamos a atividade da ECA cardíaca e circulante dos camundongos KO aos três e sete meses de idade pelo método fluorimétrico.

Como demonstrado nos resultados, a atividade da ECA cardíaca está aumentada apenas na cardiomiopatia leve e a atividade da ECA circulante está aumentada na cardiomiopatia grave. Acreditamos que a atividade da ECA circulante não exerce grande papel na formação de Ang II cardíaca. Além disso, sugerimos que o aumento da atividade da ECA cardíaca contribui para a formação de Ang II no coração, porém não é o componente do SRA limitante na formação de Ang II, uma vez que observamos aos sete meses de idade, fase em que os camundongos KO desenvolvem cardiomiopatia grave com sinais de IC, o aumento das concentrações de Ang II cardíaca sem alteração da atividade de ECA cardíaca.

Em humanos, a ECA cardíaca parece não ser a principal enzima que converte Ang I em Ang II. URATA et al. (1990) demonstraram que a ECA é responsável por 20% da formação de Ang II no coração de humanos. A quimase, armazenada nas *mast cells* presentes no coração, parece ser a enzima responsável pela conversão de Ang I em Ang II no coração. Apesar disso, pacientes com cardiomiopatia dilatada idiopática e pacientes com IC apresentaram atividade da ECA cardíaca aumentada, e o tratamento com inibidores da ECA foi capaz de reverter o remodelamento cardíaco maléfico. Recentemente, VAN DE WAL,

PLOKKER, LOK, BOOMSMA, VAN DER HORST, VAN VELDHUISEN, VAN GILST e VOORS (2006) demonstraram que pacientes com IC, mesmo melhorando a função cardíaca após um período de tratamento com inibidores da ECA, apresentaram aumento de 45% da concentração de Ang II circulante. Os autores sugeriram que na IC ocorre um escape da ECA. Recentemente, FLEMING, KOHLSTEDT e BUSSE (2005) descreveram que possivelmente esse escape de ECA está relacionado à inibição da ECA, que por sua vez ativa a caseína quinase 2 (CK 2) via fosforilação da serina 1270 da ECA ancorada no endotélio dos vasos cardíacos. Como consequência ocorre a ativação das MAPKs e um aumento da expressão gênica da ECA. Esses dados sugerem que em situações patológicas, a ECA tem maior participação no remodelamento cardíaco maléfico em humanos e a inibição dessa metaloprotease apresenta respostas cardioprotetoras ainda desconhecidas.

### 6.2.3 Atividade da renina plasmática

GOODMAN e GILMAN (2003) descreveram que a renina liberada pelos rins é um fator limitante na formação de Ang II. Entretanto, DZAU (1987) observou que diferentes tecidos expressavam RNA mensageiro para renina e sugeriu que a produção local de renina poderia exercer importante papel na regulação do SRA local.

Recentemente, SAUZEAU et al. (2006) desenvolveram um modelo de camundongos com deleção do proto-oncogene Vav 3 e observaram que os animais apresentavam hiperatividade nervosa simpática semelhante ao nosso. Aos quatro meses de idade os animais apresentavam hipertrofia cardíaca, elevados níveis de Ang II e noradrenalina circulantes, atividade da renina plasmática aumentada e aumento na deposição de colágeno nos rins. Na tentativa de estudar o efeito da hiperatividade do SNS sobre o SRA os autores administraram durante oito semanas o  $\beta$ -bloqueador de primeira geração propranolol. Após o tratamento, constatou-se que os animais regrediram o remodelamento cardíaco patológico, normalizaram os níveis de Ang II e noradrenalina circulantes, diminuíram a atividade da renina plasmática e reverteram a deposição de colágeno nos rins. Entretanto, uma limitação

do trabalho foi deixar de avaliar os componentes do SRA no coração e melhor entender a interação entre os SNS e SRA localmente no tecido cardíaco.

Na tentativa de estudar o efeito da hiperatividade nervosa simpática sobre a participação da peptidase renina circulante na formação de Ang II cardíaca, avaliamos a atividade da renina plasmática durante a progressão da cardiomiopatia induzida por hiperatividade simpática. Como apresentado nos resultados, a renina plasmática estava significativamente elevada nos camundongos KO aos três meses de idade (cardiomiopatia leve). Entretanto aos sete meses (cardiomiopatia grave), os camundongos apresentaram valores extremamente baixos de atividade da renina plasmática.

Acreditamos que a hiperatividade nervosa simpática observada nos camundongos KO aos três meses de idade estimulou a síntese e liberação exacerbada de renina pelas células justaglomerulares renais e refletiu no aumento da atividade da renina plasmática, uma vez que o SNS é um dos principais fatores que estimulam a liberação de renina nos rins. Após interpretar os dados observados nos camundongos KO aos sete meses, acreditamos que durante um período prolongado, a hiperativação nervosa simpática acarretou na diminuição da atividade da renina circulante. Provavelmente essa diminuição na atividade da renina plasmática ocorreu devido a uma lesão renal decorrente da hiperatividade nervosa simpática, o que acarretaria em diminuição na síntese de renina pelas células justaglomerulares. Como apresentado nos resultados referentes ao peso úmido dos rins, apenas aos sete meses de idade os camundongos KO apresentaram aumento no peso dos rins, podendo indicar algum tipo de lesão renal. Tentamos realizar a análise anátomo-patológica dos rins desses animais, porém não encontramos alterações estruturais. Segundo o patologista que realizou as análises, o rim de camundongos é difícil de ser analisado e pode não apresentar sinais de lesões normalmente observados em rins de outros animais.

Na tentativa de melhor compreender essa resposta de diminuição da atividade da renina plasmática nos camundongos KO aos sete meses de idade, tratamos esses animais a partir do quinto mês, diariamente, durante oito semanas com o  $\beta$ -bloqueador de segunda geração metoprolol e, curiosamente, constatamos

que o tratamento com o  $\beta$ -bloqueador restaurou a atividade da renina plasmática aos valores do grupo controle, bem como normalizou o peso dos rins. Dessa forma, sugerimos que cronicamente a hiperatividade nervosa simpática diminui a atividade da renina plasmática. No entanto, o mecanismo envolvido nessa resposta ainda precisa ser melhor investigado.

Curiosamente, independente da atividade da renina plasmática os camundongos KO mantiveram os níveis de Ang II cardíacos elevados. Uma das hipóteses que acreditamos é que a renina produzida localmente no coração possa estar compensando essa queda da atividade da renina plasmática e mantendo os níveis elevados de Ang II cardíaca. Recentemente, MACKINS, KANO, SEYEDI, SCHAFER, REID, MACHIDA, SILVER e LEVI (2006) e LE e COFFMAN (2006) demonstraram que as *mast cells* presentes no coração, além de apresentarem grandes quantidades de quimases, expressam RNA mensageiro para a renina e apresentam quantidades significantes de renina. As *mast cells* são células derivadas de regiões hematopoiéticas progenitoras que migram para tecidos vascularizados e acomodam-se nos tecidos quando maduras, exercendo importante papel nas respostas inflamatórias (GALLI, KALESNIKOFF, GRIMBALDESTON, PILIPONSKY, WILLIAMS & TSAI, 2005). Quando a degranulação das *mast cells* presentes no coração é induzida, a renina liberada tem grande eficiência em converter angiotensinogênio em Ang I no coração (SILVER, REID, MACKINS, ASKWITH, SCHAEFER, HERZLINGER & LEVI, 2004). Além disso, MACKINS et al. (2006) também verificaram que a liberação da renina por meio da degranulação das *mast cells* promove a formação de Ang I local em quantidades suficientes para causar conseqüências patológicas, incluindo exacerbada liberação de noradrenalina cardíaca e desenvolvimento de arritmias. Recentemente, HARA, ONO, HWANG, IWASAKI, OKADA, NAKATANI, SASAYAMA e MATSUMORI (2002) descreveram que as *mast cells* exercem importante papel na progressão da disfunção ventricular esquerda em modelo animal de IC. Dessa forma, acreditamos que as *mast cells* possam estar colaborando para a liberação de renina localmente no coração e manutenção dos níveis elevados de Ang II no coração dos camundongos com deleção dos receptores  $\alpha_{2A}$  e  $\alpha_{2C}$ -adrenérgicos.

#### 6.2.4 Expressão protéica dos receptores de Ang II cardíacos e renina nos rins

Quando ativados, os receptores de Ang II, subtipos AT<sub>1</sub> e AT<sub>2</sub>, são responsáveis pelo início da propagação do sinal intracelular que leva ao aumento da expressão de genes específicos envolvidos no remodelamento cardíaco. No coração de ratos adultos, os receptores AT<sub>1</sub> e AT<sub>2</sub> apresentam afinidades semelhantes pelo ligante Ang II (SECHI, GRIFFIN, GRADY, KALINYAK & SCHAMBELAN, 1992). Entretanto, em cultura de cardiomiócito de ratos neonatos, o receptor AT<sub>1</sub> apresenta maior afinidade pela Ang II (ROGERS, GAA & ALLEN, 1986). Atualmente, é bem conhecido que os receptores de Ang II, mais especificamente o receptor AT<sub>1</sub>, estão envolvidos nos processos de hipertrofia cardíaca e proliferação de fibroblasto cardíaco (DE GASPARO et al., 2000). Os receptores de Ang II estão hiperexpressos no tecido cardíaco em situações patológicas como infarto do miocárdio (MEGGS, COUPET, HUANG, CHENG, LI, CAPASSO, HOMCY & ANVERSA, 1993) e durante o remodelamento cardíaco patológico (SUZUKI, MATSUBARA, URAKAMI & INADA, 1993). Entretanto, corações de humanos em estágio final da IC apresentaram diminuição da expressão gênica para o AT<sub>1</sub> (REGITZ-ZAGROSEK, FRIEDEL, HEYMANN, BAUER, NEUSS, ROLFS, STEFFEN, HILDEBRANDT, HETZER & FLECK, 1995). PARADIS, DALI-YOUCHEF, PARADIS, THIBAUT e NEMER (2000) constataram que camundongos que hiperexpressavam o receptor AT<sub>1</sub> cardíaco desenvolveram, em situações basais, hipertrofia cardíaca semelhante à hipertrofia cardíaca observada em pacientes portadores de IC.

Atualmente, pouco se sabe sobre a influência da hiperatividade nervosa simpática sobre a densidade e função dos receptores de Ang II. BARKI-HARRINGTON, LUTTRELL e ROCKMAN (2003) sugeriram que os receptores  $\beta$ -adrenérgicos e o receptor de Ang II, subtipo AT<sub>1</sub> são capazes de se regularem entre si por meio de interações físicas denominadas dimerizações de receptores. Dessa forma, os autores provaram que a inibição do receptor  $\beta$ -adrenérgico é capaz de diminuir a hidrólise do IP<sub>2</sub> via receptor de Ang II, subtipo AT<sub>1</sub>, e minimizar as respostas celulares desencadeadas pelo SRA.

Na tentativa de melhor compreender o efeito do SNS sobre os receptores de Ang II, avaliamos a expressão protéica dos receptores AT<sub>1</sub> e AT<sub>2</sub> pela técnica de *western blotting*. Conforme demonstrado nos resultados, os camundongos KO não apresentaram diferenças na expressão dos receptores de Ang II quando comparados aos animais do grupo controle nas diferentes faixas etárias. Acreditamos que a técnica utilizada limitou uma melhor avaliação dos receptores de Ang II nesses animais, uma vez que esses receptores estão expressos no coração em pequenas quantidades. Talvez a avaliação da expressão dos receptores por PCR complementar nossos resultados e ajudaria a entender melhor o efeito da hiperatividade nervosa simpática sobre os receptores de Ang II cardíacos.

Com o objetivo de complementar os dados referentes à atividade da renina plasmática dos camundongos KO, avaliamos a expressão da renina nos rins pela técnica de *western blotting*. Como demonstrado nos resultados, a expressão da renina nos rins apresentou um comportamento semelhante à atividade da renina plasmática, onde observamos aumento na expressão nos animais KO aos três meses de idade (cardiomiopatia leve) e diminuição na expressão nos animais KO aos sete meses de idade (cardiomiopatia grave). Esse experimento serviu para confirmar que realmente os rins estão sintetizando quantidades menores de renina aos sete meses de idade em consequência da crônica hiperatividade nervosa simpática apresentada pelos camundongos KO.

#### 6.2.5 Expressão gênica do angiotensinogênio cardíaco

O angiotensinogênio é continuamente sintetizado e secretado pelo fígado, e uma série de hormônios como: glicocorticóides, hormônio tireoidiano e Ang II estimulam sua síntese (CAMPBELL & HABENER, 1986; DOSTAL & BAKER, 1999). Os níveis de angiotensinogênio circulantes são similares ao Km da renina pelo seu substrato (aproximadamente 1mM). Conseqüentemente, a freqüência de síntese de Ang II pode ser diretamente influenciada pelos níveis de angiotensinogênio (GOODMAN & GILMAN, 2003).

Atualmente sabe-se que o coração de camundongos (DZAU et al., 1987), ratos (LINDPAINTNER, LU, NEIDERMAJER, SCHIEFFER, JUST, GANTEN & DREXLER, 1993), cachorros (LEE, LIANG, LEE & LINDPAINTNER, 1996), e humanos (PAUL, POYAN MEHR & KREUTZ, 2006; PAUL, WAGNER & DZAU, 1993) apresentam níveis detectáveis de RNA mensageiro para o angiotensinogênio. Em situações patológicas como sobrecarga pressórica crônica (BAKER, CHERNIN, WIXSON & ACETO, 1990), taquicardia induzida por marcapasso (LINDPAINTNER et al., 1993) e IC induzida por ligadura da coronária (FINCKH, HELLMANN, GANTEN, FURTWANGLER, ALLGEIER, BOLTZ & HOLTZ, 1991), a expressão gênica do angiotensinogênio cardíaco está aumentada, sugerindo que a produção local de angiotensinogênio cardíaco pode exercer importante papel no controle do SRA local cardíaco e estimular o remodelamento cardíaco desencadeado por situações patológicas. MAZZOLAI, NUSSBERGER, AUBERT, BRUNNER, GABBIANI, BRUNNER e PEDRAZZINI (1998) demonstraram que camundongos que hiperexpressavam angiotensinogênio cardíaco apresentaram concentrações elevadas de Ang II cardíaca e hipertrofia do cardiomiócito independente de alterações na pressão arterial, indicando o angiotensinogênio cardíaco como um fator limitante na formação de Ang II local no coração.

Durante a progressão da IC, um dos fatores que estimula a síntese de angiotensinogênio cardíaco é a reprogramação gênica. Esse processo tem como intuito preservar a função ventricular. Entretanto, cronicamente essa reprogramação contribui de maneira significativa para a deterioração do coração. Um exemplo do efeito da reprogramação gênica sobre o SRA na IC é a estimulação da síntese de angiotensinogênio cardíaco pelo aumento da expressão de ANP (peptídeo natriurético atrial) e BNP (peptídeo natriurético cerebral) no coração. Em condições patológicas, a sobrecarga mecânica e a hiperativação neuro-humoral estimulam a expressão de ANP e BNP no coração (DOSTAL & BAKER, 1999). Embora o ANP seja sintetizado em sua maior parte nos átrios, durante a reprogramação gênica os ventrículos passam também a expressá-lo. DOSTAL e BAKER (1999) constataram que a ativação do receptor de ANP, bem como receptores acoplados ao GMPc

(monofosfato cíclico de guanosina) aumentavam a expressão gênica do angiotensinogênio e renina em cultura de cardiomiócitos e fibroblastos de ratos neonatos. Assim como existe um ciclo vicioso observado entre o SNS e o SRA na progressão da IC, parece existir um ciclo vicioso entre os fatores pró-hipertróficos ANP e BNP e o SRA, uma vez que a Ang II estimula a síntese e liberação de ANP em cultura de cardiomiócitos de ratos neonatos (DOSTAL & BAKER, 1999).

Mesmo não avaliando os fatores pró-hipertróficos ANP e BNP, acreditamos que os camundongos com deleção dos receptores  $\alpha_{2A}$  e  $\alpha_{2C}$ -adrenérgicos apresentam uma reprogramação gênica durante a progressão da cardiomiopatia induzida por hiperatividade nervosa simpática e, como consequência, elevação dos níveis de ANP e BNP cardíacos. Esse aumento dos fatores pró-hipertróficos contribui para a síntese do angiotensinogênio cardíaco e o desenvolvimento da hipertrofia dos cardiomiócitos e acúmulo de colágeno cardíaco, levando ao remodelamento cardíaco patológico e à disfunção ventricular. Assim como a reprogramação gênica, os glicocorticóides, os hormônios tireoidianos e o estrogênio aumentam os níveis de RNA mensageiro do angiotensinogênio em cultura de cardiomiócitos de ratos neonatos (CAMPBELL & HABENER, 1986; DOSTAL & BAKER, 1999).

Atualmente a literatura apresenta poucas informações referentes ao efeito do SNS na síntese de angiotensinogênio cardíaco. Na tentativa de elucidar melhor essa interação, DOSTAL e BAKER (1999) trataram uma cultura de cardiomiócitos de ratos neonatos com isoproterenol e observaram um aumento nos níveis de RNA mensageiro para o angiotensinogênio. Os autores sugeriram que o fibroblasto foi o principal responsável pela síntese de angiotensinogênio cardíaco induzida por isoproterenol.

Como pode-se observar, grande parte dos estudos que analisam a expressão gênica dos componentes do SRA no tecido cardíaco utilizam cultura de cardiomiócitos de ratos neonatos. Uma das limitações desses trabalhos é que a utilização de cultura celular de cardiomiócitos neonatos pode não refletir o comportamento das células adultas e não reproduzir situações patológicas como a IC. Dessa forma, para melhor compreender o efeito da hiperatividade nervosa simpática sobre o SRA avaliamos a expressão gênica do angiotensinogênio no

coração dos camundongos KO nas diferentes fases da cardiomiopatia pelo método de PCR em tempo real.

Conforme observado nos resultados, os camundongos KO apresentaram elevados níveis de RNA mensageiro para o angiotensinogênio cardíaco nas diferentes fases da cardiomiopatia induzida por hiperatividade simpática. Acreditamos que a síntese de angiotensinogênio cardíaco induzida por hiperatividade nervosa simpática é o fator limitante na formação de Ang II cardíaca, uma vez que analisamos a correlação entre a expressão gênica do angiotensinogênio cardíaco e a concentração de Ang II cardíaca e encontramos uma correlação positiva significativa ( $r=0,8$  e  $p<0,05$ ).

Para comprovar a hipótese, que o angiotensinogênio é fator limitante na formação de Ang II cardíaca nos camundongos KO, pretendemos avaliar a expressão do angiotensinogênio cardíaco e quantificação da Ang II no ventrículo esquerdo dos camundongos KO tratados com metoprolol ( $\beta$ -bloqueador de segunda geração), losartan e metoprolol associado ao losartan.

#### 6.2.6 Concentrações de noradrenalina circulante e cardíaca

A avaliação das concentrações de noradrenalina circulante e cardíaca pelo HPLC foi fundamental para avaliar a atividade nervosa simpática apresentada pelos camundongos com deleção dos receptores  $\alpha_{2A}$  e  $\alpha_{2C}$ -adrenérgicos nas faixas etárias de três e sete meses de idade e melhor compreender a interação entre os SNS e SRA na progressão da cardiomiopatia induzida por hiperatividade nervosa simpática. Como observado nos resultados, aos três meses de idade os animais KO apresentaram níveis elevados de noradrenalina cardíaca. Esses resultados caracterizaram a hiperatividade nervosa simpática local no coração. Acreditamos que aos sete meses de idade o nível de noradrenalina cardíaca diminuiu pelo fato de uma possível depleção dos estoques de noradrenalina no terminal nervoso simpático cardíaco em decorrência da hiperatividade nervosa simpática crônica. Quando avaliamos a concentração de noradrenalina plasmática, observamos que nas duas faixas etárias analisadas, os camundongos KO apresentaram níveis elevados de

noradrenalina, entretanto, somente aos sete meses de idade essa diferença foi significativa em relação ao grupo controle.

Acreditamos que a possível depleção dos estoques de noradrenalina cardíaca foi influenciada pelas elevadas concentrações de Ang II cardíaca, uma vez que a Ang II, via receptor  $AT_1$ , estimula diretamente a síntese e liberação de noradrenalina nos terminais nervosos (GELBAND et al., 1997). KAWAI et al. (1999) demonstraram que cachorros com IC apresentaram diminuição na liberação de noradrenalina no terminal nervoso cardíaco após tratamento de seis semanas com os inibidores da ECA enalapril e ramipril. Os autores também constataram uma restauração da densidade dos receptores  $\beta$ -adrenérgicos cardíacos e melhora da função cardíaca após o período de tratamento. Na tentativa de estudar o efeito da Ang II sobre a liberação de noradrenalina cardíaca, avaliaremos as concentrações de noradrenalina cardíaca nos camundongos KO tratados com losartan (antagonista do receptor de Ang II, subtipo  $AT_1$ ) durante a transição da cardiomiopatia de grau moderado (cinco meses de idade) para a cardiomiopatia grave (sete meses de idade).

Vale a pena ressaltar que, além da dosagem das concentrações de noradrenalina cardíaca e circulante, experimentos realizados no laboratório demonstraram que os camundongos KO apresentaram tônus simpático aumentado aos três e sete meses de idade. Sendo assim, com base nesses dados somados à taquicardia basal apresentada pelos animais KO nas diferentes faixas etárias podemos sugerir que os camundongos com deleção dos receptores  $\alpha_{2A}$  e  $\alpha_{2C}$ -adrenérgicos apresentam hiperatividade nervosa simpática aos três e sete meses de idade, corroborando os dados de HEIN, LIMBIRD, EGLIN e KOBILKA (1999).

## 7 CONCLUSÃO

Os resultados sugerem que o sistema renina angiotensina cardíaco está hiperativado nas diferentes fases da cardiomiopatia induzida por hiperatividade nervosa simpática e contribui de maneira significativa para o remodelamento cardíaco maléfico e o agravamento da disfunção cardíaca nesse modelo genético. Dessa forma, concluímos que a interação entre os SNS e SRA cardíaco exerce importante papel na progressão da IC. Portanto, os camundongos com deleção dos receptores  $\alpha_{2A}$  e  $\alpha_{2C}$ -adrenérgicos são um ótimo modelo experimental para estudos futuros que utilizem inibidores dos componentes do SRA e SNS como estratégias terapêuticas da IC. Esses animais também permitirão o estudo das vias intracelulares envolvidas no remodelamento cardíaco na IC, assim como na sua regressão pelos tratamentos farmacológicos convencionais da síndrome.

## REFERÊNCIAS

ALTMAN, J. D.; TRENDELENBURG, A. U.; MACMILLAN, L.; BERNSTEIN, D.; LIMBIRD, L.; STARKE, K.; KOBILKA, B. K.; HEIN, L. Abnormal regulation of the sympathetic nervous system in alpha2A-adrenergic receptor knockout mice. Molecular Pharmacology, Bethesda, v.56, n.1, p.154-61, 1999.

ANVERSA, P.; OLIVETTI, G.; CAPASSO, J. M. Cellular basis of ventricular remodeling after myocardial infarction. American Journal of Cardiology, Ann Arbor, v.68, n.14, p.7D-16D, 1991.

ARAUJO, M. C.; MELO, R. L.; CESARI, M. H.; JULIANO, M. A.; JULIANO, L.; CARMONA, A. K. Peptidase specificity characterization of C- and N-terminal catalytic sites of angiotensin I-converting enzyme. Biochemistry, Bethesda, v.39, n.29, p.8519-25, 2000.

BADER, M.; PETERS, J.; BALTATU, O.; MULLER, D. N.; LUFT, F. C.; GANTEN, D. Tissue renin-angiotensin systems: new insights from experimental animal models in hypertension research. Journal of Molecular Medicine, New York, v.79, n.2-3, p.76-102, 2001.

BAKER, K. M.; CHERNIN, M. I.; WIXSON, S. K.; ACETO, J. F. Renin-angiotensin system involvement in pressure-overload cardiac hypertrophy in rats. American Journal of Physiology, Bethesda, v.259, n.2 Pt 2, p.H324-32, 1990.

BALTATU, O.; BADER, M. Brain renin-angiotensin system. Lessons from functional genomics. Neuroendocrinology, Bethesda, v.78, n.5, p.253-9, 2003.

BARKI-HARRINGTON, L.; LUTTRELL, L. M.; ROCKMAN, H. A. Dual inhibition of beta-adrenergic and angiotensin II receptors by a single antagonist: a functional role for receptor-receptor interaction in vivo. Circulation, v.108, n.13, p.1611-8, 2003.

BERNSTEIN, D. Exercise assessment of transgenic models of human cardiovascular disease. Physiological Genomics, New York, v.13, n.3, p.217-26, 2003.

BIGGER JUNIOR, J. T. Why patients with congestive heart failure die: arrhythmias and sudden cardiac death. Circulation, v.75, n.5 Pt 2, p.IV28-35, 1987.

BLANCHET, M.; DUCHARME, A.; RACINE, N.; ROULEAU, J. L.; TARDIF, J. C.; JUNEAU, M.; MARQUIS, J.; LARIVÉE, L.; NIGAM, A.; FORTIER, A.; WHITE, M. Effects of cold exposure on submaximal exercise performance and adrenergic activation in patients with congestive heart failure and the effects of beta-adrenergic blockade (carvedilol or metoprolol). American Journal of Cardiology, Dallas, v.92, n.5, p.548-53, 2003.

BLANKESTIJN, P. J. Sympathetic hyperactivity in chronic kidney disease. Nephrology Dialyse Transplantation, Bethesda, v.19, n.6, p.1354-7, 2004.

BLUMENFELD, J. D.; SEALEY, J. E.; MANN, S. J.; BRAGAT, A.; MARION, R.; PECKER, M. S.; SOTELO, J.; AUGUST, P.; PICKERING, T. G.; LARAGH, J. H. Beta-adrenergic receptor blockade as a therapeutic approach for suppressing the renin-angiotensin-aldosterone system in normotensive and hypertensive subjects. American Journal of Hypertension, Dallas, v.12, n.5, p.451-9, 1999.

BOERO, R.; PIGNATARO, A.; FERRO, M.; QUARELLO, F. Sympathetic nervous system and chronic renal failure. Clinical Experimental of Hypertension, New York, v.23, n.1-2, p.69-75, 2001.

BOHM, M.; CASTELLANO, M.; FLESCH, M.; MAACK, C.; MOLL, M.; PAUL, M.; SCHIFFER, F.; ZOLK, O. Chamber-specific alterations of norepinephrine uptake sites in cardiac hypertrophy. Hypertension, Dallas, v.32, n.5, p.831-7, 1998.

BONET, S.; AGUSTI, A.; ARNAU, J. M.; VIDAL, X.; DIOGENE, E.; GALVE, E.; LAPORTE, J. R. Beta-adrenergic blocking agents in heart failure: benefits of vasodilating and non-vasodilating agents according to patients' characteristics: a meta-analysis of clinical trials. Archieve of International Medicine, New York, v.160, n.5, p.621-7, 2000.

BOWERS, R. R.; GETTYS, T. W.; PRPIC, V.; HARRIS, R. B.; BARTNESS, T. J. Short photoperiod exposure increases adipocyte sensitivity to noradrenergic stimulation in Siberian hamsters. American Journal of Physiology American Journal of Physiology Regulatory Integrative Comparative Physiology, Betheseda, v.288, n.5, p.R1354-60, 2005.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal Biochemistry, New York, v.72, p.248-54, 1976.

BRISTOW, M. R. Changes in myocardial and vascular receptors in heart failure. Journal of American College Cardiology, Dallas, v.22, n.4 Suppl A, p.61A-71A, 1993.

BROSNIHAN, K. B.; LI, P.; FERRARIO, C. M. Angiotensin-(1-7) dilates canine coronary arteries through kinins and nitric oxide. Hypertension, Dallas, v.27, n.3 Pt 2, p.523-8, 1996.

BROWN, L. The Criteria Committee of New York Heart Association. Boston. 1994. 253-256 p.

BRUM, P. C.; KOSEK, J.; PATTERSON, A.; BERNSTEIN, D.; KOBILKA, B. Abnormal cardiac function associated with sympathetic nervous system hyperactivity in mice. American Journal of Physiology Heart Circulatory Physiology, Bethesda, v.283, n.5, p.H1838-45, 2002.

BRUM, P. C.; ROLIM, N. P.; BACURAU, A. V.; MEDEIROS, A. Neurohumoral activation in heart failure: the role of adrenergic receptors. Anais Academia Brasileira de Ciências, Rio de Janeiro, v.78, n.3, p.485-503, 2006.

CAMPBELL, D. J. Circulating and tissue angiotensin systems. Journal of Clinical Investigation, London, v.79, n.1, p.1-6, 1987.

CAMPBELL, D. J.; HABENER, J. F. Angiotensinogen gene is expressed and differentially regulated in multiple tissues of the rat. Journal of Clinical Investigation, v.78, n.1, p.31-9, 1986.

CHIDA, K.; OTANI, H.; KOHZUKI, M.; SAITO, H.; KAGAYA, Y.; TAKAI, Y.; TAKAHASHI, S.; YAMADA, S.; ZUGUCHI, M. The relationship between plasma BNP level and the myocardial phosphocreatine/adenosine triphosphate ratio determined by phosphorus-31 magnetic resonance spectroscopy in patients with dilated cardiomyopathy. Cardiology, Dallas, v.106, n.3, p.132-6, 2006.

CICOGNA, M. P.; OKOSHI, K. História natura da remodelação cardíaca: da agressão aos sintomas. Revista da Sociedade de Cardiologia do Estado de São Paulo, São Paulo, v.10, p.8-16, 2000.

CODY, R. J. The integrated effects of angiotensin II. American Journal of Cardiology, Bethesda, v.79, n.5A, p.9-11, 1997.

COHEN SOLAL, A.; JONDEAU, G.; BEAUVAIS, F.; BERDEAUX, A. Beneficial effects of carvedilol on angiotensin-converting enzyme activity and renin plasma levels in patients with chronic heart failure. The European Journal of Heart Failure, Goteborg, v.6, n.4, p.463-6, 2004.

COHN, J. N.; LEVINE, T. B.; OLIVARI, M. T.; GARBERG, V.; LURA, D.; FRANCIS, G. S.; SIMON, A. B.; RECTOR, T. Plasma norepinephrine as a guide to prognosis in patients with chronic congestive heart failure. New England Journal Medicine, London, v.311, n.13, p.819-23, 1984.

COLE, J. M.; XIAO, H.; ADAMS, J. W.; DISHER, K. M.; ZHAO, H.; BERNSTEIN, K. E. New approaches to genetic manipulation of mice: tissue-specific expression of ACE. American Journal of Physiology Renal Physiology, Bethesda, v.284, n.4, p.F599-607, 2003.

COLUCCI, W. S. The effects of norepinephrine on myocardial biology: implications for the therapy of heart failure. Clinical Cardiology, New York, v.21, n.12 Suppl 1, p.120-4, 1998.

DAVIES, J. I.; WITHAM, M. D.; STRUTHERS, A. D. Autonomic effects of spironolactone and MR blockers in heart failure. Heart Failure Review, New York, v.10, n.1, p.63-9, 2005.

DE GASPARO, M.; CATT, K. J.; INAGAMI, T.; WRIGHT, J. W.; UNGER, T. International union of pharmacology. XXIII. The angiotensin II receptors. Pharmacology Review, London, v.52, n.3, p.415-72, 2000.

DE LANNOY, L. M.; DANSER, A. H.; VAN KATS, J. P.; SCHOEMAKER, R. G.; SAXENA, P. R.; SCHALEKAMP, M. A. Renin-angiotensin system components in the interstitial fluid of the isolated perfused rat heart. Local production of angiotensin I. Hypertension, Dallas, v.29, n.6, p.1240-51, 1997.

DE MATOS, L. D.; GARDENGHI, G.; RONDON, M. U.; SOUFEN, H. N.; TIRONE, A. P.; BARRETTO, A. C.; BRUM, P. C.; MIDDLEKAUFF, H. R.; NEGRAO, C. E. Impact of 6 months of therapy with carvedilol on muscle sympathetic nerve activity in heart failure patients. Journal of Cardiac Failure, New York, v.10, n.6, p.496-502, 2004.

DE MELLO, W. C.; DANSER, A. H. Angiotensin II and the heart : on the intracrine renin-angiotensin system. Hypertension, New York, v.35, n.6, p.1183-8, 2000.

DE SIMONE, G.; PALMIERI, V. [Echocardiographic evaluation of ventricular hypertrophy]. Recent Progression Medicine, Dallas, v.93, n.1, p.58-62, 2002.

DENDORFER, A.; RAASCH, W.; TEMPEL, K.; DOMINIAK, P. Interactions between the renin-angiotensin system (RAS) and the sympathetic system. Basic Research Cardiology, New York, v.93 Suppl 2, p.24-9, 1998.

DEVIC, E.; XIANG, Y.; GOULD, D.; KOBILKA, B. Beta-adrenergic receptor subtype-specific signaling in cardiac myocytes from beta(1) and beta(2) adrenoceptor knockout mice. Molecular Pharmacology, Bethesda, v.60, n.3, p.577-83, 2001.

DORN 2ND, G. W.; FORCE, T. Protein kinase cascades in the regulation of cardiac hypertrophy. Journal of Clinical Investigation, London, v.115, n.3, p.527-37, 2005.

DOSTAL, D. E.; BAKER, K. M. The cardiac renin-angiotensin system: conceptual, or a regulator of cardiac function? Circulation Research, Dallas, v.85, n.7, p.643-50, 1999.

DZAU, V. J. Implications of local angiotensin production in cardiovascular physiology and pharmacology. American Journal of Cardiology, New York, v.59, n.2, p.59A-65A, 1987.

DZAU, V. J.; ELLISON, K. E.; BRODY, T.; INGELFINGER, J.; PRATT, R. E. A comparative study of the distributions of renin and angiotensinogen messenger ribonucleic acids in rat and mouse tissues. Endocrinology, Dallas, v.120, n.6, p.2334-8, 1987.

DZAU, V. J.; RE, R. Tissue angiotensin system in cardiovascular medicine. A paradigm shift? Circulation, Dallas, v.89, n.1, p.493-8, 1994.

DZAU, V. J.; RE, R. N. Evidence for the existence of renin in the heart. Circulation, Dallas, v.75, n.1 Pt 2, p.1134-6, 1987.

ESCHENHAGEN, T.; MENDE, U.; DIEDERICH, M.; NOSE, M.; SCHMITZ, W.; SCHOLZ, H.; SCHULTE AM ESCH, J.; WARNHOLTZ, A.; SCHAFFER, H. Long term beta-adrenoceptor-mediated up-regulation of Gi alpha and G(o) alpha mRNA levels and pertussis toxin-sensitive guanine nucleotide-binding proteins in rat heart. Molecular Pharmacology, Bethesda, v.42, n.5, p.773-83, 1992.

FALKENHAHN, M.; FRANKE, F.; BOHLE, R. M.; ZHU, Y. C.; STAUSS, H. M.; BACHMANN, S.; DANILOV, S.; UNGER, T. Cellular distribution of angiotensin-converting enzyme after myocardial infarction. Hypertension, New York, v.25, n.2, p.219-26, 1995.

FERGUSON, D. W.; ABOUD, F. M.; MARK, A. L. Selective impairment of baroreflex-mediated vasoconstrictor responses in patients with ventricular dysfunction. Circulation, Dallas, v.69, n.3, p.451-60, 1984.

FERREIRA, J. C.; ROLIM, N.; GRANÁ, O.; BARTHOLOMEU, J., B.; BRUM, P. C. Padronização da intensidade de treinamento físico aeróbio em esteira para camundongos. Revista da Sociedade de Cardiologia do Estado de São Paulo, São Paulo, v.14, n.3, p.74, 2004.

FIGUEROA, M. S.; PETERS, J. I. Congestive heart failure: Diagnosis, pathophysiology, therapy, and implications for respiratory care. Respiratory Care, New York, v.51, n.4, p.403-12, 2006.

FINCKH, M.; HELLMANN, W.; GANTEN, D.; FURTWANGLER, A.; ALLGEIER, J.; BOLTZ, M.; HOLTZ, J. Enhanced cardiac angiotensinogen gene expression and angiotensin converting enzyme activity in tachypacing-induced heart failure in rats. Basic Research Cardiology, Heidelberg, v.86, n.4, p.303-16, 1991.

FLEMING, I.; KOHLSTEDT, K.; BUSSE, R. New fACEs to the renin-angiotensin system. Physiology (Bethesda), Bethesda, v.20, p.91-5, 2005.

FLORAS, J. S. Clinical aspects of sympathetic activation and parasympathetic withdrawal in heart failure. Journal of American College Cardiology, Dallas, v.22, n.4 Suppl A, p.72A-84A, 1993.

FRIGERIO, M.; ROUBINA, E. Drugs for left ventricular remodeling in heart failure. American Journal of Cardiology, Dallas, v.96, n.12A, p.10L-18L, 2005.

GAFFNEY, T. E.; CHIDSEY, C. A.; BRAUNWALD, E. Study of the relationship between the neurotransmitter store and adrenergic nerve block induced by reserpine and guanethidine. Circulation Research, Dallas, v.12, p.264-8, 1963.

GALLI, S. J.; KALESNIKOFF, J.; GRIMBALDESTON, M. A.; PILIPONSKY, A. M.; WILLIAMS, C. M.; TSAI, M. Mast cells as "tunable" effector and immunoregulatory cells: recent advances. Annual Review of Immunology, Bethesda, v.23, p.749-86, 2005.

GELBAND, C. H.; SUMNERS, C.; LU, D.; RAIZADA, M. K. Angiotensin receptors and norepinephrine neuromodulation: implications of functional coupling. Regulatory Peptides, New York, v.72, n.2-3, p.139-45, 1997.

GERHARDSTEIN, B. L.; PURI, T. S.; CHIEN, A. J.; HOSEY, M. M. Identification of the sites phosphorylated by cyclic AMP-dependent protein kinase on the beta 2 subunit of L-type voltage-dependent calcium channels. Biochemistry, Bethesda, v.38, n.32, p.10361-70, 1999.

GOODMAN, G.; GILMAN, N. As bases farmacológicas da terapêutica. Boston: MacGraw-Hill. 2003

GRIENDLING, K. K.; MURPHY, T. J.; ALEXANDER, R. W. Molecular biology of the renin-angiotensin system. Circulation, Dallas, v.87, n.6, p.1816-28, 1993.

GRIGIONI, F.; RUSSO, A.; POTENA, L.; IELASI, A.; FABBRI, F.; BACCHI-REGGIANI, L.; CARIGI, S.; MUSURACA, A. C.; BIGLIARDI, M.; COCCOLO, F.; MAGNANI, G.; SPECCHIA, S.; MAGELLI, C.; BRANZI, A. Static and dynamic predictors of adverse events in patients with intermediate cardiopulmonary capacity referred for heart transplantation. Journal of Heart Lung Transplantation, New York, v.25, n.1, p.85-9, 2006.

GUAZZI, M.; PALERMO, P.; PONTONE, G.; SUSINI, F.; AGOSTONI, P. Synergistic efficacy of enalapril and losartan on exercise performance and oxygen consumption at peak exercise in congestive heart failure. American Journal of Cardiology, Madison, v.84, n.9, p.1038-43, 1999.

GUYATT, G. H.; DEVEREAUX, P. J. A review of heart failure treatment. Mont Sinai Journal Medicine, Basingstoke, v.71, n.1, p.47-54, 2004.

HANSEN, E. F.; BENDTSEN, F.; HENRIKSEN, J. H. Effects on plasma angiotensin-converting enzyme activity and circulating renin of lisinopril and enalapril alone and in combination with propranolol in healthy volunteers. Basic and Clinical Pharmacology and Toxicology, São Carlos, v.84, n.3, p.110-4, 1999.

HARA, M.; ONO, K.; HWANG, M. W.; IWASAKI, A.; OKADA, M.; NAKATANI, K.; SASAYAMA, S.; MATSUMORI, A. Evidence for a role of mast cells in the evolution to congestive heart failure. Journal of Experimental Medicine, New York, v.195, n.3, p.375-81, 2002.

HEIN, L.; ALTMAN, J. D.; KOBILKA, B. K. Two functionally distinct alpha2-adrenergic receptors regulate sympathetic neurotransmission. Nature, Basingstoke, v.402, n.6758, p.181-4, 1999.

HEIN, L.; LIMBIRD, L. E.; EGLIN, R. M.; KOBILKA, B. K. Gene substitution/knockout to delineate the role of alpha 2-adrenoceptor subtypes in mediating central effects of catecholamines and imidazolines. Annals of the New York Academy of Sciences, New York, v.881, p.265-71, 1999.

HIRSCH, A. T.; TALSNESS, C. E.; SCHUNKERT, H.; PAUL, M.; DZAU, V. J. Tissue-specific activation of cardiac angiotensin converting enzyme in experimental heart failure. Circulation Research, Dallas, v.69, n.2, p.475-82, 1991.

HOKIMOTO, S.; YASUE, H.; FUJIMOTO, K.; YAMAMOTO, H.; NAKAO, K.; KAIKITA, K.; SAKATA, R.; MIYAMOTO, E. Expression of angiotensin-converting enzyme in remaining viable myocytes of human ventricles after myocardial infarction. Circulation, Dallas, v.94, n.7, p.1513-8, 1996.

INAGAKI, K.; IWANAGA, Y.; SARAI, N.; ONOZAWA, Y.; TAKENAKA, H.; MOCHLY-ROSEN, D.; KIHARA, Y. Tissue angiotensin II during progression or ventricular hypertrophy to heart failure in hypertensive rats; differential effects on PKC epsilon and PKC beta. Journal of Molecular Cell Cardiology, New York, v.34, n.10, p.1377-85, 2002.

IWAI, N.; INAGAMI, T. Identification of two subtypes in the rat type I angiotensin II receptor. FEBS Letter, New York, v.298, n.2-3, p.257-60, 1992.

JANOSI, A.; GHALI, J. K.; HERLITZ, J.; CZURIGA, I.; KLIBANER, M.; WIKSTRAND, J.; HJALMARSON, A. Metoprolol CR/XL in postmyocardial infarction patients with chronic heart failure: experiences from MERIT-HF. American Heart Journal, Dallas, v.146, n.4, p.721-8, 2003.

JUNQUEIRA, L. C.; COSSERMELLI, W.; BRENTANI, R. Differential staining of collagens type I, II and III by Sirius Red and polarization microscopy. Archieve of International Medicine, Tóquio, v.41, n.3, p.267-74, 1978.

KATZ, A. M. Potential deleterious effects of inotropic agents in the therapy of chronic heart failure. Circulation, Dallas, v.73, n.3 Pt 2, p.III184-90, 1986.

\_\_\_\_\_. Heart failure: a hemodynamic disorder complicated by maladaptive proliferative responses. Journal of Cell Molecular Medicine, New York, v.7, n.1, p.1-10, 2003.

KAWAI, H.; FAN, T. H.; DONG, E.; SIDDIQUI, R. A.; YATANI, A.; STEVENS, S. Y.; LIANG, C. S. ACE inhibition improves cardiac NE uptake and attenuates sympathetic nerve terminal abnormalities in heart failure. American Journal of Physiology, Bethesda, v.277, n.4 Pt 2, p.H1609-17, 1999.

KAYE, D.; ESLER, M. Sympathetic neuronal regulation of the heart in aging and heart failure. Cardiovascular Research, Dallas, v.66, n.2, p.256-64, 2005.

KIM, S. D. Measurement of the renin-angiotensin system in heart failure. Biological Research for Nursing, Las Vegas, v.1, n.3, p.210-26, 2000.

KOUCHI, I.; ZOLK, O.; JOCKENHOVEL, F.; ITTER, G.; LINZ, W.; CREMERS, B.; BOHM, M. Increase in G(i alpha) protein accompanies progression of post-infarction remodeling in hypertensive cardiomyopathy. Hypertension, New York, v.36, n.1, p.42-7, 2000.

KREUTZ, R.; FERNANDEZ-ALFONSO, M. S.; LIU, Y.; GANTEN, D.; PAUL, M. Induction of cardiac angiotensin I-converting enzyme with dietary NaCl-loading in genetically hypertensive and normotensive rats. Journal of Molecular Cell Cardiology, New York, v.73, n.5, p.243-8, 1995.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature, Basingstoke, v.227, n.5259, p.680-5, 1970.

LAKE-BRUSE, K. D.; SIGMUND, C. D. Transgenic and knockout mice to study the renin-angiotensin system and other interacting vasoactive pathways. Current Hypertension, New York, v.2, n.2, p.211-6, 2000.

LAVOIE, J. L.; BIANCO, R. A.; SAKAI, K.; KEEN, H. L.; RYAN, M. J.; SIGMUND, C. D. Transgenic mice for studies of the renin-angiotensin system in hypertension. Acta of Physiology Scandinavian, Estocolmo, v.181, n.4, p.571-7, 2004.

LE, T. H.; COFFMAN, T. M. A new cardiac MASTer switch for the renin-angiotensin system. J Clin Invest, v.116, n.4, p.866-9, 2006.

LEE, Y. A.; LIANG, C. S.; LEE, M. A.; LINDPAINTNER, K. Local stress, not systemic factors, regulate gene expression of the cardiac renin-angiotensin system in vivo: a comprehensive study of all its components in the dog. Proc Natl Acad Sci U S A, New York, v.93, n.20, p.11035-40, 1996.

LEVI, R.; SILVER, R. B.; MACKINS, C. J.; SEYEDI, N.; KOYAMA, M. Activation of a renin-angiotensin system in ischemic cardiac sympathetic nerve endings and its association with norepinephrine release. International Immunopharmacology, Bethesda, v.2, n.13-14, p.1965-73, 2002.

LIAO, Y.; ASAKURA, M.; TAKASHIMA, S.; OGAI, A.; ASANO, Y.; SHINTANI, Y.; MINAMINO, T.; ASANUMA, H.; SANADA, S.; KIM, J.; KITAMURA, S.; TOMOIKE, H.; HORI, M.; KITAKAZE, M. Celiprolol, a vasodilatory beta-blocker, inhibits pressure overload-induced cardiac hypertrophy and prevents the transition to heart failure via nitric oxide-dependent mechanisms in mice. Circulation, Dallas, v.110, n.6, p.692-9, 2004.

LIN, S. Y.; GOODFRIEND, T. L. Angiotensin receptors. American Journal of Physiology, Bethesda, v.218, n.5, p.1319-28, 1970.

LINDPAINTNER, K.; LU, W.; NEIDERMAJER, N.; SCHIEFFER, B.; JUST, H.; GANTEN, D.; DREXLER, H. Selective activation of cardiac angiotensinogen gene expression in post-infarction ventricular remodeling in the rat. Journal of Molecular Cell Cardiology, Cleveland, v.25, n.2, p.133-43, 1993.

LIOU, Y. M.; CHANG, J. C. Differential pH effect on calcium-induced conformational changes of cardiac troponin C complexed with cardiac and fast skeletal isoforms of troponin I and troponin T. Journal of Biochemistry (Tokyo), Tokyo, v.136, n.5, p.683-92, 2004.

LIU, Y.; LERI, A.; LI, B.; WANG, X.; CHENG, W.; KAJSTURA, J.; ANVERSA, P. Angiotensin II stimulation in vitro induces hypertrophy of normal and postinfarcted ventricular myocytes. Circulation Research, Dallas, v.82, n.11, p.1145-59, 1998.

LOOT, A. E.; ROKS, A. J.; HENNING, R. H.; TIO, R. A.; SUURMEIJER, A. J.; BOOMSMA, F.; VAN GILST, W. H. Angiotensin-(1-7) attenuates the development of heart failure after myocardial infarction in rats. Circulation, Dallas, v.105, n.13, p.1548-50, 2002.

LUNDE, P. K.; SJAASTAD, I.; SCHIOTZ THORUD, H. M.; SEJERSTED, O. M. Skeletal muscle disorders in heart failure. Acta of Physiology Scandinavian, Estocolmo, v.171, n.3, p.277-94, 2001.

MAACK, C.; ELTER, T.; NICKENIG, G.; LAROSEE, K.; CRIVARO, M.; STABLEIN, A.; WUTTKE, H.; BOHM, M. Prospective crossover comparison of carvedilol and metoprolol in patients with chronic heart failure. Journal of American College Cardiology, New York, v.38, n.4, p.939-46, 2001.

MACKINS, C. J.; KANO, S.; SEYEDI, N.; SCHAFER, U.; REID, A. C.; MACHIDA, T.; SILVER, R. B.; LEVI, R. Cardiac mast cell-derived renin promotes local angiotensin formation, norepinephrine release, and arrhythmias in ischemia/reperfusion. Journal of Clinical Investigation, London, v.116, n.4, p.1063-70, 2006.

MALHOTRA, A.; KANG, B. P.; OPAWUMI, D.; BELIZAIRE, W.; MEGGS, L. G. Molecular biology of protein kinase C signaling in cardiac myocytes. Molecular Cell Biochemistry, New York, v.225, n.1-, p.97-107, 2001.

MANN, D. L. Left ventricular size and shape: determinants of mechanical signal transduction pathways. Heart Failure Review, New York, v.10, n.2, p.95-100, 2005.

MARTIN, N. P.; WHALEN, E. J.; ZAMAH, M. A.; PIERCE, K. L.; LEFKOWITZ, R. J. PKA-mediated phosphorylation of the beta1-adrenergic receptor promotes Gs/Gi switching. Cell Signalling, Baltimore, v.16, n.12, p.1397-403, 2004.

MAZZOLAI, L.; NUSSBERGER, J.; AUBERT, J. F.; BRUNNER, D. B.; GABBIANI, G.; BRUNNER, H. R.; PEDRAZZINI, T. Blood pressure-independent cardiac hypertrophy induced by locally activated renin-angiotensin system. Hypertension, v.31, n.6, p.1324-30, 1998.

MCKELVIE, R. S.; ROULEAU, J. L.; WHITE, M.; AFZAL, R.; YOUNG, J. B.; MAGGIONI, A. P.; HELD, P.; YUSUF, S. Comparative impact of enalapril, candesartan or metoprolol alone or in combination on ventricular remodelling in patients with congestive heart failure. European Heart Journal, London, v.24, n.19, p.1727-34, 2003.

MCKELVIE, R. S.; YUSUF, S.; PERICAK, D.; AVEZUM, A.; BURNS, R. J.; PROBSTFIELD, J.; TSUYUKI, R. T.; WHITE, M.; ROULEAU, J.; LATINI, R.; MAGGIONI, A.; YOUNG, J.; POGUE, J. Comparison of candesartan, enalapril, and their combination in congestive heart failure: randomized evaluation of strategies for left ventricular dysfunction (RESOLVD) pilot study. The RESOLVD Pilot Study Investigators. Circulation, Dallas, v.100, n.10, p.1056-64, 1999.

MEDEIROS, A.; OLIVEIRA, E. M.; GIANOLLA, R.; CASARINI, D. E.; NEGRAO, C. E.; BRUM, P. C. Swimming training increases cardiac vagal activity and induces cardiac hypertrophy in rats. Brazilian Journal of Medical Biology Research, São Paulo, v.37, n.12, p.1909-17, 2004.

MEGGS, L. G.; COUPET, J.; HUANG, H.; CHENG, W.; LI, P.; CAPASSO, J. M.; HOMCY, C. J.; ANVERSA, P. Regulation of angiotensin II receptors on ventricular myocytes after myocardial infarction in rats. Circulation Research, Dallas, v.72, n.6, p.1149-62, 1993.

NGUYEN, G.; BURCKLE, C. A.; SRAER, J. D. Renin/prorenin-receptor biochemistry and functional significance. Current Hypertension Reports, São Paulo, v.6, n.2, p.129-32, 2004.

NGUYEN, G.; DELARUE, F.; BURCKLE, C.; BOUZHIR, L.; GILLER, T.; SRAER, J. D. Pivotal role of the renin/prorenin receptor in angiotensin II production and cellular responses to renin. Journal of Clinical Investigation, London, v.109, n.11, p.1417-27, 2002.

NICOLETTI, I.; CICOIRA, M.; ZANOLLA, L.; FRANCESCHINI, L.; BRIGHETTI, G.; PILATI, M.; ZARDINI, P. Skeletal muscle abnormalities in chronic heart failure patients: relation to exercise capacity and therapeutic implications. Congestive Heart Failure, New York, v.9, n.3, p.148-54, 2003.

NIENABER, J. J.; TACHIBANA, H.; NAGA PRASAD, S. V.; ESPOSITO, G.; WU, D.; MAO, L.; ROCKMAN, H. A. Inhibition of receptor-localized PI3K preserves cardiac beta-adrenergic receptor function and ameliorates pressure overload heart failure. Journal of Clinical Investigation, London, v.112, n.7, p.1067-79, 2003.

NISHI, I.; KAWANO, S.; MISAKI, M.; HOSHI, T.; MASUMI, T.; IIDA, K.; WATANABE, S.; YAMAGUCHI, I. Addition of spironolactone to an angiotensin-converting enzyme inhibitor decreases lung congestion and edema in Dahl hypertensive rats. Heart Vessels, New York, v.21, n.4, p.251-5, 2006.

NOUET, S.; NAHMIAS, C. Signal transduction from the angiotensin II AT2 receptor. Trends Endocrinology Metabolism, New York, v.11, n.1, p.1-6, 2000.

O'MEARA, E.; SOLOMON, S.; MCMURRAY, J.; PFEFFER, M.; YUSUF, S.; MICHELSON, E.; GRANGER, C.; OLOFSSON, B.; YOUNG, J. B.; SWEDBERG, K. Effect of candesartan on New York Heart Association functional class. Results of the Candesartan in Heart failure: Assessment of Reduction in Mortality and morbidity (CHARM) programme. European Heart Journal, London, v.25, n.21, p.1920-6, 2004.

OMURA, T.; YOSHIYAMA, M.; MATSUMOTO, R.; KUSUYAMA, T.; ENOMOTO, S.; NISHIYA, D.; IZUMI, Y.; KIM, S.; ICHIJO, H.; MOTOJIMA, M.; AKIOKA, K.; IWAO, H.; TAKEUCHI, K.; YOSHIKAWA, J. Role of c-Jun NH2-terminal kinase in G-protein-coupled receptor agonist-induced cardiac plasminogen activator inhibitor-1 expression. Journal of Molecular Cell Cardiology, Dallas, v.38, n.4, p.583-92, 2005.

PACKER, M. Interaction of prostaglandins and angiotensin II in the modulation of renal function in congestive heart failure. Circulation, Dallas, v.77, n.6 Pt 2, p.164-73, 1988.

PALATINI, P.; BENETOS, A.; JULIUS, S. Impact of increased heart rate on clinical outcomes in hypertension: implications for antihypertensive drug therapy. Drugs, Baltimore, v.66, n.2, p.133-44, 2006.

PALATINI, P.; JULIUS, S. Relevance of heart rate as a risk factor in hypertension. Current Hypertension Reports, New York, v.1, n.3, p.219-24, 1999.

\_\_\_\_\_. Elevated heart rate: a major risk factor for cardiovascular disease. Clinical Experimental of Hypertension, New York, v.26, n.7-8, p.637-44, 2004.

PARADIS, P.; DALI-YOUCHEF, N.; PARADIS, F. W.; THIBAUT, G.; NEMER, M. Overexpression of angiotensin II type I receptor in cardiomyocytes induces cardiac hypertrophy and remodeling. PNAS U S A, New York, v.97, n.2, p.931-6, 2000.

PAUL, M.; POYAN MEHR, A.; KREUTZ, R. Physiology of local renin-angiotensin systems. Physiology Review, Bethesda, v.86, n.3, p.747-803, 2006.

PAUL, M.; WAGNER, D.; METZGER, R.; GANTEN, D.; LANG, R. E.; SUZUKI, F.; MURAKAMI, K.; BURBACH, J. H.; LUDWIG, G. Quantification of renin mRNA in various mouse tissues by a novel solution hybridization assay. Journal of Hypertension, New York, v.6, n.3, p.247-52, 1988.

PAUL, M.; WAGNER, J.; DZAU, V. J. Gene expression of the renin-angiotensin system in human tissues. Quantitative analysis by the polymerase chain reaction. Journal of Clinical Investigation, v.91, n.5, p.2058-64, 1993.

PENG, H.; CARRETERO, O. A.; VULJAJ, N.; LIAO, T. D.; MOTIVALA, A.; PETERSON, E. L.; RHALEB, N. E. Angiotensin-converting enzyme inhibitors: a new mechanism of action. Circulation, Dallas, v.112, n.16, p.2436-45, 2005.

PETERS, J.; CLAUSMEYER, S. Intracellular sorting of renin: cell type specific differences and their consequences. Journal of Molecular Cell Cardiology, Dallas, v.34, n.12, p.1561-8, 2002.

PIEPOLI, M. F.; KACZMAREK, A.; FRANCIS, D. P.; DAVIES, L. C.; RAUCHHAUS, M.; JANKOWSKA, E. A.; ANKER, S. D.; CAPUCCI, A.; BANASIAK, W.; PONIKOWSKI, P. Reduced peripheral skeletal muscle mass and abnormal reflex physiology in chronic heart failure. Circulation, Dallas, v.114, n.2, p.126-34, 2006.

PINTO, Y. M.; BUIKEMA, H.; VAN GILST, W. H.; SCHOLTENS, E.; VAN GEEL, P. P.; DE GRAEFF, P. A.; WAGNER, J.; PAUL, M. Cardiovascular end-organ damage in Ren-2 transgenic rats compared to spontaneously hypertensive rats. Journal of Molecular Medicine, Dallas, v.75, n.5, p.371-7, 1997.

POKHAREL, S.; SHARMA, U. C.; PINTO, Y. M. Left ventricular hypertrophy: virtuous intentions, malign consequences. International Journal of Biochemical Cell Biology, New York, v.35, n.6, p.802-6, 2003.

REGITZ-ZAGROSEK, V.; FRIEDEL, N.; HEYMANN, A.; BAUER, P.; NEUSS, M.; ROLFS, A.; STEFFEN, C.; HILDEBRANDT, A.; HETZER, R.; FLECK, E. Regulation, chamber localization, and subtype distribution of angiotensin II receptors in human hearts. Circulation, Dallas, v.91, n.5, p.1461-71, 1995.

REMO, E. F. Heart failure management. Prevention of pulmonary edema is essential. Advanced Nurse Practise, New York, v.13, n.12, p.27-8, 30, 62, 2005.

ROGERS, T. B.; GAA, S. T.; ALLEN, I. S. Identification and characterization of functional angiotensin II receptors on cultured heart myocytes. Journal of Pharmacology and Experimental Therapy, Bethesda, v.236, n.2, p.438-44, 1986.

ROVEDA, F.; MIDDLEKAUFF, H. R.; RONDON, M. U.; REIS, S. F.; SOUZA, M.; NASTARI, L.; BARRETTO, A. C.; KRIEGER, E. M.; NEGRAO, C. E. The effects of exercise training on sympathetic neural activation in advanced heart failure: a randomized controlled trial. Journal of American College Cardiology, Dallas, v.42, n.5, p.854-60, 2003.

RUBIM, V. S.; DRUMOND NETO, C.; ROMEO, J. L.; MONTERA, M. W. [Prognostic value of the Six-Minute Walk Test in heart failure]. Arquivos Brasileiros de Cardiologia, São Paulo, v.86, n.2, p.120-5, 2006.

RUNDQVIST, B.; ELAM, M.; EISENHOFER, G.; FRIBERG, P. Normalization of total body and regional sympathetic hyperactivity in heart failure after heart transplantation. Journal of Heart Lung Transplantation, Baltimore, v.15, n.5, p.516-26, 1996.

SADOSHIMA, J.; IZUMO, S. Signal transduction pathways of angiotensin II--induced c-fos gene expression in cardiac myocytes in vitro. Roles of phospholipid-derived second messengers. Circulation Research, Dallas, v.73, n.3, p.424-38, 1993.

SAHN, D. J.; DEMARIA, A.; KISSLO, J.; WEYMAN, A. Recommendations regarding quantitation in M-mode echocardiography: results of a survey of echocardiographic measurements. Circulation, Dallas, v.58, n.6, p.1072-83, 1978.

SANTOS, R. A.; CASTRO, C. H.; GAVA, E.; PINHEIRO, S. V.; ALMEIDA, A. P.; PAULA, R. D.; CRUZ, J. S.; RAMOS, A. S.; ROSA, K. T.; IRIGOYEN, M. C.; BADER, M.; ALENINA, N.; KITTEN, G. T.; FERREIRA, A. J. Impairment of in vitro and in vivo heart function in angiotensin-(1-7) receptor MAS knockout mice. Hypertension, New York, v.47, n.5, p.996-1002, 2006.

SARIS, J. J.; VAN DEN EIJNDEN, M. M.; LAMERS, J. M.; SAXENA, P. R.; SCHALEKAMP, M. A.; DANSER, A. H. Prorenin-induced myocyte proliferation: no role for intracellular angiotensin II. Hypertension, New York, v.39, n.2 Pt 2, p.573-7, 2002.

SAUZEAU, V.; SEVILLA, M. A.; RIVAS-ELENA, J. V.; DE ALAVA, E.; MONTERO, M. J.; LOPEZ-NOVOA, J. M.; BUSTELO, X. R. Vav3 proto-oncogene deficiency leads to sympathetic hyperactivity and cardiovascular dysfunction. Nature Medicine, Basingstoke, v.12, n.7, p.841-5, 2006.

SCHUNKERT, H.; DZAU, V. J.; TANG, S. S.; HIRSCH, A. T.; APSTEIN, C. S.; LORELL, B. H. Increased rat cardiac angiotensin converting enzyme activity and mRNA expression in pressure overload left ventricular hypertrophy. Effects on coronary resistance, contractility, and relaxation. Journal of Clinical Investigation, London, v.86, n.6, p.1913-20, 1990.

SECHI, L. A.; GRIFFIN, C. A.; GRADY, E. F.; KALINYAK, J. E.; SCHAMBELAN, M. Characterization of angiotensin II receptor subtypes in rat heart. Circulation Research, Dallas, v.71, n.6, p.1482-9, 1992.

SHEERAN, F. L.; PEPE, S. Energy deficiency in the failing heart: linking increased reactive oxygen species and disruption of oxidative phosphorylation rate. Biochemical and Biophysical Acta, New York, v.1757, n.5-6, p.543-52, 2006.

SILVER, R. B.; REID, A. C.; MACKINS, C. J.; ASKWITH, T.; SCHAEFER, U.; HERZLINGER, D.; LEVI, R. Mast cells: a unique source of renin. PNAS U S A, New York, v.101, n.37, p.13607-12, 2004.

SIMMERMAN, H. K.; JONES, L. R. Phospholamban: protein structure, mechanism of action, and role in cardiac function. Physiology Review, Bethesda, v.78, n.4, p.921-47, 1998.

SIMPSON, P.; MCGRATH, A.; SAVION, S. Myocyte hypertrophy in neonatal rat heart cultures and its regulation by serum and by catecholamines. Circulation Research, Dallas, v.51, n.6, p.787-801, 1982.

SIRAGY, H. Angiotensin II receptor blockers: review of the binding characteristics. American Journal of Cardiology, Dallas, v.84, n.10A, p.3S-8S, 1999.

STEIN, K. M.; KARAGOUNIS, L. A.; ANDERSON, J. L.; KLIGFIELD, P.; LERMAN, B. B. Fractal clustering of ventricular ectopy correlates with sympathetic tone preceding ectopic beats. Circulation, Dallas, v.91, n.3, p.722-7, 1995.

SULAKHE, P. V.; VO, X. T. Regulation of phospholamban and troponin-I phosphorylation in the intact rat cardiomyocytes by adrenergic and cholinergic stimuli: roles of cyclic nucleotides, calcium, protein kinases and phosphatases and depolarization. Molecular Cell Biochemistry, Bethesda, v.149-150, p.103-26, 1995.

SUMNERS, C.; ZHU, M.; GELBAND, C. H.; POSNER, P. Angiotensin II type 1 receptor modulation of neuronal K<sup>+</sup> and Ca<sup>2+</sup> currents: intracellular mechanisms. American Journal of Physiology, Bethesda, v.271, n.1 Pt 1, p.C154-63, 1996.

SUN, Y.; CLEUTJENS, J. P.; DIAZ-ARIAS, A. A.; WEBER, K. T. Cardiac angiotensin converting enzyme and myocardial fibrosis in the rat. Cardiovascular Research, Dallas, v.28, n.9, p.1423-32, 1994.

SUZUKI, J.; MATSUBARA, H.; URAKAMI, M.; INADA, M. Rat angiotensin II (type 1A) receptor mRNA regulation and subtype expression in myocardial growth and hypertrophy. Circulation Research, Dallas, v.73, n.3, p.439-47, 1993.

TAN, L. B.; JALIL, J. E.; PICK, R.; JANICKI, J. S.; WEBER, K. T. Cardiac myocyte necrosis induced by angiotensin II. Circulation Research, Dallas, v.69, n.5, p.1185-95, 1991.

TOWBIN, H.; OZBEY, O.; ZINGEL, O. An immunoblotting method for high-resolution isoelectric focusing of protein isoforms on immobilized pH gradients. Electrophoresis, London, v.22, n.10, p.1887-93, 2001.

TSUTSUI, H.; IDE, T.; KINUGAWA, S. Mitochondrial oxidative stress, DNA damage, and heart failure. Antioxidant Redox Signalling, New York, v.8, n.9-10, p.1737-44, 2006.

URATA, H.; HEALY, B.; STEWART, R. W.; BUMPUS, F. M.; HUSAIN, A. Angiotensin II-forming pathways in normal and failing human hearts. Circulation Research, Dallas, v.66, n.4, p.883-90, 1990.

URATA, H.; NISHIMURA, H.; GANTEN, D. Chymase-dependent angiotensin II forming systems in humans. American Journal of Hypertension, New York, v.9, n.3, p.277-84, 1996.

VAN DE WAL, R. M.; PLOKKER, H. W.; LOK, D. J.; BOOMSMA, F.; VAN DER HORST, F. A.; VAN VELDHUISEN, D. J.; VAN GILST, W. H.; VOORS, A. A. Determinants of increased angiotensin II levels in severe chronic heart failure patients despite ACE inhibition. Int J Cardiol, v.106, n.3, p.367-72, 2006.

VAN DEN BOSCH, A. E.; ROBBERS-VISSER, D.; KRENNING, B. J.; MCGHIE, J. S.; HELBING, W. A.; MEIJBOOM, F. J.; ROOS-HESELINK, J. W. Comparison of real-time three-dimensional echocardiography to magnetic resonance imaging for assessment of left ventricular mass. American Journal of Cardiology, Dallas, v.97, n.1, p.113-7, 2006.

VON LUTTEROTTI, N.; CATANZARO, D. F.; SEALEY, J. E.; LARAGH, J. H. Renin is not synthesized by cardiac and extrarenal vascular tissues. A review of experimental evidence. Circulation, Dallas, v.89, n.1, p.458-70, 1994.

WALLUKAT, G. The beta-adrenergic receptors. Herz, Bethesda, v.27, n.7, p.683-90, 2002.

WALLUKAT, G.; PODLOWSKI, S.; NISSEN, E.; MORWINSKI, R.; CSONKA, C.; TOSAKI, A.; BLASIG, I. E. Functional and structural characterization of anti-beta1-adrenoceptor autoantibodies of spontaneously hypertensive rats. Molecular Cell Biochemistry, Bethesda, v.251, n.1-2, p.67-75, 2003.

WANG, D.; GELBAND, C. H.; SUMNERS, C.; POSNER, P. Mechanisms underlying the chronotropic effect of angiotensin II on cultured neurons from rat hypothalamus and brain stem. Journal of Neurophysiology, Bethesda, v.78, n.2, p.1013-20, 1997.

WANG, D.; SUMNERS, C.; POSNER, P.; GELBAND, C. H. A-type K<sup>+</sup> current in neurons cultured from neonatal rat hypothalamus and brain stem: modulation by angiotensin II. Journal of Neurophysiology, Bethesda, v.78, n.2, p.1021-9, 1997.

WANG, M.; YIP, G. W.; WANG, A. Y.; ZHANG, Y.; HO, P. Y.; TSE, M. K.; YU, C. M.; SANDERSON, J. E. Tissue Doppler imaging provides incremental prognostic value in patients with systemic hypertension and left ventricular hypertrophy. Journal of Hypertension, Dallas, v.23, n.1, p.183-91, 2005.

WOLLERT, K. C.; DREXLER, H. The renin-angiotensin system and experimental heart failure. Cardiovascular Research, Dallas, v.43, n.4, p.838-49, 1999.

XAVIER-NETO, J.; PEREIRA, A. C.; JUNQUEIRA, M. L.; CARMONA, R.; KRIEGER, J. E. Rat angiotensin-converting enzyme promoter regulation by beta-adrenergics and cAMP in endothelium. Hypertension, New York, v.34, n.1, p.31-8, 1999.

XIANG, Y.; KOBILKA, B. K. Myocyte adrenoceptor signaling pathways. Science, New York, v.300, n.5625, p.1530-2, 2003.

XIE, Q. Y.; SUN, M.; YANG, T. L.; SUN, Z. L. Losartan reduces monocyte chemoattractant protein-1 expression in aortic tissues of 2K1C hypertensive rats. International Journal of Cardiology, Dallas, v.110, n.1, p.60-6, 2006.

YAN, Y.; CHEN, R.; PITARRESI, T.; SIGMUND, C. D.; GROSS, K. W.; SEALEY, J. E.; LARAGH, J. H.; CATANZARO, D. F. Kidney is the only source of human plasma renin in 45-kb human renin transgenic mice. Circulation Research, Dallas, v.83, n.12, p.1279-88, 1998.

YONEMOCHI, H.; YASUNAGA, S.; TESHIMA, Y.; IWAO, T.; AKIYOSHI, K.; NAKAGAWA, M.; SAIKAWA, T.; ITO, M. Mechanism of beta-adrenergic receptor upregulation induced by ACE inhibition in cultured neonatal rat cardiac myocytes: roles of bradykinin and protein kinase C. Circulation, Dallas, v.97, n.22, p.2268-73, 1998.

YOUNG, J. B.; DUNLAP, M. E.; PFEFFER, M. A.; PROBSTFIELD, J. L.; COHEN-SOLAL, A.; DIETZ, R.; GRANGER, C. B.; HRADEC, J.; KUCH, J.; MCKELVIE, R. S.; MCMURRAY, J. J.; MICHELSON, E. L.; OLOFSSON, B.; OSTERGREN, J.; HELD, P.; SOLOMON, S. D.; YUSUF, S.; SWEDBERG, K. Mortality and morbidity reduction with Candesartan in patients with chronic heart failure and left ventricular systolic dysfunction: results of the CHARM low-left ventricular ejection fraction trials. Circulation, Dallas, v.110, n.17, p.2618-26, 2004.

ZHAO, X. L.; GUTIERREZ, L. M.; CHANG, C. F.; HOSEY, M. M. The alpha 1-subunit of skeletal muscle L-type Ca channels is the key target for regulation by A-kinase and protein phosphatase-1C. Biochemical and Biophysical Research Community, Baltimore, v.198, n.1, p.166-73, 1994.

ZHU, W. Z.; ZHENG, M.; KOCH, W. J.; LEFKOWITZ, R. J.; KOBILKA, B. K.; XIAO, R. P. Dual modulation of cell survival and cell death by beta(2)-adrenergic signaling in adult mouse cardiac myocytes. PNAS U S A, New York, v.98, n.4, p.1607-12, 2001.