

UNIVERSIDADE FEDERAL DE OURO PRETO
NÚCLEO DE PESQUISAS EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

**EFEITOS DO ANÁLOGO NÃO PEPTÍDICO
DA ANG-(1-7), AVE 0991, SOBRE
PARÂMETROS CARDIOVASCULARES E
RENAIS EM RATOS COM HIPERTENSÃO
RENOVASCULAR 2R1C**

Thelma Maria Bedeti Cunha

Ouro Preto – MG

2011

Thelma Maria Bedeti Cunha

**EFEITOS DO ANÁLOGO NÃO PEPTÍDICO
DA ANG-(1-7), AVE 0991, SOBRE
PARÂMETROS CARDIOVASCULARES E
RENAIS EM RATOS COM HIPERTENSÃO
RENOVASCULAR 2R1C**

Orientadora: Andréia Carvalho Alzamora

Co-orientador: Wanderson Geraldo de Lima

Dissertação apresentada ao programa de pós-graduação de Ciências Biológicas do Núcleo de Pesquisas em Ciências Biológicas da Universidade Federal de Ouro Preto, como parte integrante dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas, área de concentração Bioquímica Estrutural e Fisiológica.

C972e **Cunha, Thelma Maria Bedeti.**

Efeitos do análogo não peptídico da ANG-(1-7), AVE 0991, sobre parâmetros cardiovasculares e renais em ratos com hipertensão renovascular [manuscrito] / Thelma Maria Bedeti Cunha – 2011.

xvi, 74 f.: il.; graf., tab.

Orientadora: Profa. Dra. Andréia Carvalho Alzamora.

Co-orientador: Prof. Dr. Wanderson Geraldo de Lima.

Catálogo: sisbin@sisbin.ufop.br



Universidade Federal de Ouro Preto
Núcleo de Pesquisas em Ciências Biológicas - NUPEB
Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas



Ata da Banca Examinadora de Defesa de Dissertação Intitulada:

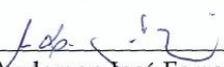
“Efeitos do análogo não peptídico da ang (1-7), AVE 0991, sobre parâmetros cardiovasculares e renais em ratos com hipertensão renovascular 2R1C”

Aos 02 dias do mês de dezembro de 2011, às 9:00h, no Auditório do NUPEB da Universidade Federal de Ouro Preto, reuniu-se a Comissão Examinadora da Dissertação da aluna Thelma Maria Bedeti Cunha. A defesa da dissertação iniciou-se pela apresentação oral feita pela candidata e, em seguida, argüição pelos membros da banca. Ao final, os membros da banca examinadora reuniram-se e decidiram por **APROUAR** a candidata. A concessão do título está condicionada ao cumprimento das demais exigências previstas no Regimento deste Programa.

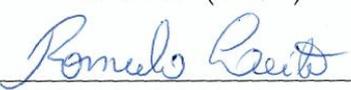
Membros da Banca Examinadora:



Prof. Dr.ª Andréia Carvalho Alzamora
Presidente



Prof. Dr. Anderson José Ferreira
Examinador (UFMG)



Prof. Dr. Rômulo Leite
Examinador (UFOP)

DATA DA DEFESA: 02/12/2011

Trabalho desenvolvido no **Laboratório de Hipertensão** da Universidade Federal de Ouro Preto, com auxílio financeiro da CAPES, REDE TOXIFAR-INCT-FAPEMIG-CNPQ, PROPP-NUPEB-UFOP.

Dedico este trabalho à minha mãe, ao meu marido e ao meu filho.

Agradecimentos

À **Deus**, por sempre colocar pessoas boas em minha vida e pela benção de me possibilitar a realização dos meus sonhos.

À minha orientadora **Prof. Dra. Andréia Carvalho Alzamora** pela confiança depositada, e pelos valiosos ensinamentos. Meu sincero OBRIGADA!

Ao meu co-orientador **Prof. Dr. Wanderson Geraldo de Lima**, por tudo que pacientemente me ensinou e pelo amparo nos momentos difíceis.

Ao meu marido **Álvaro**, amor da minha vida, por abrir mão de tanta coisa em prol da minha realização profissional e por ter me dado o presente mais precioso que pode existir, nosso filho **Gabriel**.

Ao meu filho **Gabriel**, pelos deliciosos sorrisos que fazem tudo valer a pena e por me ensinar a cada dia a ser melhor.

À minha **Mãe**, por ter me ensinado a rezar e a acreditar. Ao meu **Pai** pelo apoio. Aos meus irmãos **Gustavo** e **Thaís** pelo companheirismo. Ao pequeno **Henrique** pelas alegrias.

Ao **Prof. Dr. Robson Santos** e à **Profa. Dra. Maria José Campagnole-Santos** pelos auxílios e por acreditarem nesse trabalho.

À **Prof. Dra. Lisandra Brandino** e ao **Prof. Mauro César Isoldi** pelos ensinamentos.

À querida prima **Prof. Dra. Maria Célia da Silva Lanna**, pela torcida.

À minha sogra **Marlene** e meu sogro **Bob**, pelo abrigo e carinho.

Às minhas avós, **Ofélia** e **Sanita** pelas orações. Ao meu **avô Hélio**, pelo bom exemplo deixado e por ter me amado tanto.

À **Prof. Dra. Lidiane Aparecia Pereira de Souza** por estimular meu interesse pela pesquisa e pela disponibilidade em ajudar.

Aos amigos **Jamille**, **Everton** e **Rodrigo**, que me estenderam a mão e me ajudaram a transformar os tropeços, em recomeços. Aos demais colegas que fazem parte ou que passaram pelo Laboratório de Hipertensão, **Uberdan**, **Leo**, **Carol**, **Rosana**, **Grazi**, **Claudiane**, **Maria Andréia**, **Marco Túlio**, **Marcela TOP**, **Milla**, **Gabi** e **Amandinha**, pela amizade.

Ao **Sr. Ernani** e **Sr. Jair**, pelo cuidado com os animais.

Aos **animais**, que com inocência, sacrificaram suas vidas pela ciência.

Resumo

Avaliou-se o efeito do análogo não peptídico da Ang-(1-7), AVE 0991, sobre parâmetros cardiovasculares e renais em ratos com hipertensão renovascular. Ratos Fisher foram submetidos à cirurgia para produção da hipertensão renovascular, modelo de Goldblatt (2R1C) e posteriormente ao tratamento com AVE 0991 durante quatro semanas. Ao final do tratamento os animais tiveram sua aorta abdominal e veia femoral canuladas, e, após 24 horas, foi realizado o registro da pressão arterial média (PAM) e frequência cardíaca (FC), e a avaliação da sensibilidade do controle reflexo da FC, estando o animal acordado. Ao término do experimento foi realizada eutanásia, com retirada de coração e rins, para posterior análise histológica. Os principais dados obtidos em nosso estudo sugerem que o tratamento com AVE 0991 pode alterar os valores da PAM, de forma diferente, conforme a dose utilizada, além de prevenir o remodelamento cardíaco e renal nos animais com hipertensão renovascular. O AVE 0991 na dose 3mg/kg, reduziu os níveis de PAM basal dos ratos com hipertensão renovascular, embora não tenha abolido a hipertensão, visto que a PAM basal desse grupo de animais foi superior à PAM dos animais normotensos SHAM. Já na dose 1mg/kg, o AVE 0991 não se mostrou eficaz em reduzir os níveis basais da PAM nos ratos com hipertensão renovascular. Em relação à sensibilidade do controle reflexo da FC, o AVE 0991 na dose 3 mg/kg restaurou a sensibilidade do controle reflexo da FC, tanto sobre os componentes bradicárdico como sobre o componente taquicárdico, para níveis normais em comparação aos ratos normotensos. Entretanto, na dose 1 mg/kg apresentou melhora da sensibilidade barorreflexa nos ratos com hipertensão renovascular em relação ao componente taquicárdico. Adicionalmente, o AVE 0991 em ambas as doses, 1 ou 3 mg/kg, reduziu o número de células inflamatórias, a espessura das fibras miocárdicas dos animais hipertensos 2R1C em relação aos animais normotensos SHAM, além disso, o tratamento com AVE 0991 preveniu o desenvolvimento de fibrose cardíaca e renal nos animais hipertensos 2R1C em ambas as doses de 1 e 3 mg/kg. Em conjunto, os resultados do presente estudo reforçam a ideia de que o tratamento com AVE 0991 em animais com hipertensão renovascular apresenta um papel anti-trófico e anti-fibrótico, e induz melhora da sensibilidade barorreflexa, além de apresentar efeitos diferentes na PAM basal dependendo da dose utilizada, 1 ou 3 mg/kg.

Palavras chave: AVE 0991, Angiotensina-(1-7), hipertensão renovascular, sensibilidade do controle reflexo da FC, remodelamento cardíaco.

Abstract

We evaluated the effects of the nonpeptide Ang-(1-7) analog, AVE 0991, on cardiovascular and renal parameters in rats with renovascular hypertension. Fisher rats underwent surgery for the induction of renovascular hypertension 2K1C and then, they were submitted to treatment with AVE 0991 for four weeks. At the end of treatment the animals had their abdominal aorta and femoral vein cannulated, and after 24 hours, the mean arterial pressure (MAP), heart rate (HR), and the baroreflex sensitivity was evaluated, with awake animals. Euthanasia was performed, and heart and kidneys removed, for subsequent histological analysis. The main data obtained suggest that treatment with AVE 0991 can change the values of MAP depending on the dose used. AVE 0991 at the 3mg/kg dose, reduced the baseline levels of MAP in rats with renovascular hypertension, although hypertension was not abolished, as the baseline MAP of this group of animals was upper than the normotensive SHAM animals. In the 1mg/kg dose, AVE 0991 was not effective in reducing baseline levels of MAP in rats with renovascular hypertension. AVE 0991 at the 3 mg/kg dose restored the baroreflex sensitivity on both the components, bradycardic and tachycardic, to normal levels compared to normotensive rats. However, at the 1 mg/kg dose, AVE 0991 improved baroreflex sensitivity in 2K1C rats only in relation to the tachycardic component. In addition, AVE 0991 at both doses, 1 or 3 mg/kg, reduced the number of inflammatory cells and the thickness of the myocardial fibers on the 2K1C hypertensive animals compared to SHAM normotensive rats, and further, treatment with AVE 0991 prevented the development of cardiac and renal fibrosis in 2K1C hypertensive animals.

Key words: AVE 0991, Angiotensin-(1-7), renovascular hypertension, baroreflex sensitivity, cardiac remodeling.

Lista de Figuras

Figura 1: Cascata simplificada do SRA com foco nas vias de formação da Ang-(1-7)

Figura 2: Modelo temporal do plano experimental de trabalho.

Figura 3: Valores basais de pressão arterial média (PAM) e frequência cardíaca (FC) em ratos SHAM e 2R1C submetidos a tratamento intragástrico, por 28 dias com KOH ou AVE 0991 nas doses de 1 mg/kg ou 3 mg/kg.

Figura 4: Avaliação da sensibilidade da bradicardia reflexa em ratos SHAM ou 2R1C tratados com o veículo KOH ou com AVE 0991 na concentração de 1 mg/kg ou 3 mg/kg.

Figura 5: Avaliação da sensibilidade da taquicardia reflexa em ratos SHAM ou 2R1C tratados com o veículo KOH ou com AVE 0991 na concentração de 1 mg/kg ou 3 mg/kg.

Figura 6: Avaliação do peso úmido relativo do coração em relação ao peso corporal (g/100g) em ratos SHAM e 2R1C submetidos ao tratamento intragástrico, por 28 dias, com KOH ou AVE 0991 na dose 1 ou 3 mg/kg.

Figura 7: Avaliações histológicas do ventrículo esquerdo de ratos SHAM ou 2R1C submetidos a tratamento intragástrico, por 28 dias, com AVE 0991 na dose 1 ou 3 mg/kg ou com o veículo KOH.

Figura 8: fotomicrografias de fibras miocárdicas do ventrículo esquerdo de ratos SHAM ou 2R1C tratados com KOH ou AVE 0991 nas doses 1 ou 3 mg/kg.

Figura 9: Fotomicrografias do ventrículo esquerdo de ratos SHAM ou 2R1C tratados com KOH ou AVE 0991 nas doses 1 ou 3 mg/kg evidenciando a deposição de colágeno.

Figura 10: Avaliações do peso úmido relativo dos rins de ratos SHAM ou 2R1C tratados com KOH ou AVE 0991 nas doses 1 ou 3 mg/kg.

Figura 11: Avaliações histológicas do rim direito de ratos SHAM ou 2R1C submetidos ao tratamento intragástrico, por 28 dias, com AVE 0991 nas doses 1 ou 3 mg/kg ou com o veículo KOH.

Figura 12: Avaliações em cortes histológicos do rim esquerdo de ratos SHAM ou 2R1C submetidos a tratamento intragástrico, por 28 dias, com AVE 0991 na dose 1 ou 3 mg/kg ou do veículo KOH.

Figura 13: Fotomicrografias da região cortical do rim esquerdo de ratos SHAM ou 2R1C tratados com KOH ou AVE 0991 nas doses 1 ou 3 mg/kg evidenciando a deposição de colágeno.

Lista de Tabelas

Tabela 01: Valores de PAM e FC dos animais normotensos SHAM ou hipertensos 2R1C tratados com KOH (controle) ou tratados com AVE 0991 nas doses de 1 mg/kg ou 3 mg/kg.

Tabela 02: Sensibilidade da bradicardia reflexa, expressa pela relação $\Delta IP/ \Delta PAM$, em animais normotensos SHAM ou hipertensos 2R1C tratados com KOH (controle) ou tratados com AVE 0991 na concentração de 1 mg/kg ou 3 mg/kg.

Tabela 03: Sensibilidade da taquicardia reflexa, expressa pela relação $\Delta IP/ \Delta PAM$ (ms/mmHg) em animais normotensos SHAM ou hipertensos 2R1C tratados com KOH (controle) ou tratados com AVE 0991 na concentração de 1 mg/kg ou 3 mg/kg.

Tabela 04: Valores da relação peso úmido do coração/ peso corporal (g/100g) dos animais normotensos SHAM ou hipertensos 2R1C tratados com KOH (controle) ou tratados com AVE 0991, na concentração de 1 mg/kg ou 3 mg/kg.

Tabela 05: Avaliações histológicas e morfométricas do ventrículo esquerdo dos animais normotensos SHAM ou hipertensos 2R1C tratados com KOH ou AVE 0991 nas doses de 1 mg/kg ou 3 mg/kg.

Tabela 06 : Valores de peso úmido relativo do rim direito e esquerdo e porcentagem de redução do rim esquerdo.

Tabela 07: Avaliações histológicas e morfométricas do rim direito dos animais normotensos SHAM ou hipertensos 2R1C tratados com KOH ou AVE 0991 na dose de 1 mg/kg ou 3 mg/kg.

Tabela 8: Avaliações histológicas e morfométricas do rim esquerdo dos animais normotensos SHAM ou hipertensos 2R1C tratados com KOH ou AVE 0991 na dose de 1 mg/kg ou 3 mg/kg.

Tabela 9: Estudo de correlação entre os valores de barorreflexo e PAM, e demais parâmetros avaliados, em animais com hipertensão renovascular 2R1C, tratados com AVE 0991 na dose 1 mg/kg ou KOH.

Tabela 10: Estudo de correlação entre os valores de barorreflexo e PAM, e demais parâmetros avaliados, em animais com hipertensão renovascular 2R1C tratados com AVE 0991 na dose 3 mg/kgmg/kg ou KOH.

Lista de Abreviaturas

1R1C - um rim, um clipe

2R1C - dois rins, um clipe

Ang I - Angiotensina I

Ang II - Angiotensina II

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

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

AT₁ - Receptores angiotensinérgicos do tipo 1

AT₂ - receptores angiotensinérgicos do tipo 2

Bpm - batimentos por minuto

CVLM - Bulbo ventrolateral caudal

Δ – Delta, variação

ECA - Enzima conversora da angiotensina

ECA2- Enzima conversora da angiotensina 2

FC - Frequência cardíaca

FPR - Fluxo plasmático renal

HA - Hipertensão arterial

HE - hematoxilina eosina

HRV - Hipertensão renovascular

HVE - Hipertrofia ventricular esquerda

IP - Intervalo de pulso

ICV- Intracerebroventricular

iv – intravenoso

mmHg – milímetros de mercúrio

ms - milisegundo

NA - Núcleo ambíguo

NEP - Endopeptidase neutra

NTS - Núcleo do trato solitário

n° - número

PA - Pressão arterial

PAM - Pressão arterial média

PAP - Pressão arterial pulsátil

PCP - Prolil-carboxipeptidase

PEP - Prolil-endopeptidase

RVLM - bulbo ventrolateral rostral

SD - Sprague Dawley

SHR - Ratos espontaneamente hipertensos

SNS - sistema nervoso simpático

SRA - Sistema Renina Angiotensina

TFG - Taxa de filtração glomerular

VE - Ventrículo esquerdo

VLM - Bulbo ventrolateral

Sumário

Resumo	IX
Abstract	X
Lista de Figuras.....	XI
Lista de Tabelas	XIII
Lista de Abreviaturas	XV
1 Introdução.....	1
2 Revisão da Literatura	3
3 Objetivos	11
3.1 Objetivo geral	11
3.2 Objetivos específicos.....	11
4 Materiais e métodos	12
4.1 Animais.....	12
4.2 Protocolo experimental.....	12
4.3 Anestesia.....	13
4.4 Cirurgia para produção da hipertensão renovascular	14
4.5 Preparação dos fármacos	14
4.6 Tratamento intragástrico com AVE 0991 ou veículo KOH	15
4.7 Confeção das Cânulas.....	15
4.8 Canulação da Artéria Aorta Abdominal e Veia Femoral	16
4.9 Avaliações Cardiovasculares	16
4.9.1 Registro da Pressão Arterial	16
4.9.2 Teste da Sensibilidade do Controle Reflexo da FC	17
4.9.3 Coleta de órgãos e análise histológica.....	18
5 Resultados.....	19

5.1 Avaliação dos Parâmetros Cardiovasculares	19
5.1.1 Níveis basais de PAM e FC	19
5.2.2 Avaliação da Bradicardia Reflexa.....	22
5.2.3 Avaliação da Taquicardia Reflexa	25
5.2.4 Avaliação do Peso Úmido do Coração.....	28
5.2.5 Avaliações histológicas do coração.....	30
5.2.6 Avaliação do Peso Úmido dos Rins	35
5.2.7 Avaliações histológicas no rim direito	38
5.2.8 Avaliações histológicas no rim esquerdo	41
5.3 Estudo de correlação	45
6 Discussão.....	47
7 Conclusão	60
8 Referências	61

1 Introdução

O sistema renina angiotensina (SRA) possui um importante papel na patogênese de doenças cardiovasculares, particularmente na hipertensão arterial e remodelamento cardíaco. Dentre os componentes desse sistema, a Angiotensina-(1-7) [Ang-(1-7)] tem emergido, nos últimos anos, como alvo de estudos principalmente devido a suas ações cardioprotetoras que, frequentemente se opõem às ações da Angiotensina II (Ang II) (Santos e cols., 2000; Santos e cols., 2006; Ferrario e Trask, 2007). Ang-(1-7) pode ser formada pela enzima conversora de angiotensina 2 (ECA2), homóloga à enzima conversora de angiotensina (ECA). As ações da Ang-(1-7) foram recentemente atribuídas à sua ligação ao receptor Mas, acoplado a proteína G, participando no controle da pressão arterial (PA) (Benter e cols., 1995 e Santos e cols., 2003), no controle barorreflexo (Santos e Campagnole, 2000) assim como exercendo propriedades anti-tróficas (Tallant e cols., 2005) e anti-fibróticas (Iwata e cols., 2005). Juntos Ang-(1-7), seu receptor Mas e a ECA2, formam o eixo ECA2-Ang-(1-7)-Mas, que possui efeitos contra regulatórios, frequentemente opostos ao clássico eixo ECA-Ang II- AT₁.

Um importante avanço nos estudos relacionados às ações da Ang-(1-7) e suas possíveis aplicações farmacológicas foi a descoberta recente do análogo AVE 0991 (Wiemer e cols., 2002). Este composto é um agonista do receptor Mas, não peptídico e oralmente ativo que mimetiza os efeitos dessa angiotensina em muitos tecidos.

AVE 0991 compete pelos sítios de ligação da Ang-(1-7) e liberando óxido nítrico/superóxido com perfil similar ao observado com a Ang-(1-7) (Wiemer e cols., 2002). Outros estudos têm demonstrado que AVE 0991 age como um agonista do receptor Mas no rim (Pinheiro e cols., 2004) e nos vasos sanguíneos (Lemos e cols., 2005). Adicionalmente, AVE 0991 previne o remodelamento cardíaco (Benter e cols., 2006; Ferreira e cols. 2007; Wuo-Tao-Zeng., 2010), melhora a função cardíaca (Ferreira e cols. 2007; Zeng e cols., 2010) de maneira semelhante à Ang-(1-7).

Compostos não peptídicos são importantes na terapia farmacológica devido à sua resistência a ação de enzimas proteolíticas, oferecendo com isso, a possibilidade de ser administrada oralmente. Um crescente número de estudos sugere que componentes capazes de interferir no eixo ECA2-Ang-(1-7)-Mas podem constituir uma nova classe de medicamentos

para o tratamento de doenças cardiovasculares. Dessa forma, o AVE 0991 torna-se um candidato promissor nas terapias de doenças renovasculares (Santos e cols., 2006).

Assim, o objetivo geral do presente estudo foi avaliar o efeito da administração intragástrica de AVE0991 sobre parâmetros cardiovasculares, bem como sobre aspectos histológicos cardíacos e renais em ratos com hipertensão renovascular.

2 Revisão da Literatura

A hipertensão arterial (HA) é uma condição clínica caracterizada por níveis elevados de PA e está frequentemente associada a alterações funcionais e/ou estruturais dos órgãos-alvo (coração, cérebro, rins e vasos sanguíneos) e alterações metabólicas com aumentos do risco de eventos cardiovasculares (SBH, 2006). A mortalidade por doenças cardiovasculares cresce progressivamente com aumentos de PA a partir de 115/75 mmHg de forma linear, contínua e independente. Em 2001, em torno de 7,6 milhões de mortes ocorreram em todo o mundo, aproximadamente 14% foram atribuídas aos níveis elevados de PA sistólicas (Lawes e cols., 2008).

A hipertrofia ventricular esquerda (HVE) pode ser induzida pela hipertensão e consiste em um processo adaptativo funcional em resposta à elevação da PA periférica. Ao ser submetido a uma sobrecarga de pressão, o ventrículo esquerdo (VE) tende a dilatar como resposta inicial visando à otimização do processo contrátil (Schaper, 1998). Tal processo acarreta uma elevação no estresse da parede ventricular, levando a uma resposta fibrótica além de hipertrofia das fibras do ventrículo esquerdo. Essa hipertrofia quando acompanhada de fibrose, durante o remodelamento é um processo patológico que pode levar a perda de função (Schaper, 1998; Grobe e cols., 2006; Frohlich e cols. 1999).

Além de afetar o coração, a HA também pode provocar danos aos rins. A HA lesa o rim por três vias principais: isquemia glomerular devida à lesão vascular; hipertensão glomerular pela perda da autorregulação renal e ativação do sistema renina-angiotensina (SRA). Todas essas vias podem comprometer não apenas os vasos renais (hialinose arteriolar e/ou necrose fibrinóide) ou o glomérulo (glomerulosclerose), como também o interstício renal, causando fibrose e perda de função (Souza e cols., 2010; Klag e cols., 1996; Ljtic e cols., 2003).

A hipertensão renovascular (HRV) pode ser definida pela elevação persistente da PA secundária à estenose hemodinamicamente significativa de uma ou ambas as artérias renais, capaz de alterar a pressão de perfusão e o fluxo sanguíneo renal (Goldblatt e cols., 1934; Bortollo e Malaquias, 2011).

Goldblatt e colaboradores (1934) demonstraram a participação do rim como agente primário no surgimento da hipertensão. Utilizando modelos animais, desenvolveram a HRV, um rim, um clipe (1R1C) e dois rins, um clipe (2R1C) (Goldblatt e cols., 1934). No modelo

de hipertensão 2R1C a artéria de um dos rins fica constricta, enquanto a artéria do rim contralateral é mantida intacta (Huang e cols., 1982; Ploth, 1983; Braam e cols., 1995). O desenvolvimento da hipertensão neste modelo é acompanhado por aumentos significativos nos níveis de Ang II em ambos os rins, clipado e o rim contralateral não clipado (Kobori e cols., 2007). Os altos níveis circulantes de Ang II possuem efeitos vasculares diretos como o aumento da resistência periférica, estímulo ao sistema nervoso simpático e liberação de aldosterona o que contribui para a elevação da PA (Navar e cols., 1995).

Alguns estudos demonstraram que pequenos incrementos nos níveis plasmáticos de Ang II são capazes de induzir aumentos importantes nos níveis intrarrenais de Ang II e estes excedem os níveis plasmáticos de Ang II (Von Thun e cols., 1994; Zou e cols., 1996). Sadjadi e colaboradores (2005a) demonstraram que os níveis renais da atividade da ECA estão aumentados no rim não isquêmico nos ratos com hipertensão renal 2R1C e que aumentos nos níveis plasmáticos de Ang II elevam a Ang II renal no rim não isquêmico, sugerindo que o mecanismo de elevação dos níveis renais de Ang II é dependente da ECA (Sadjadi e cols., 2005a). Esses mesmos autores, em outro estudo, também mostraram que a produção de Ang II pode ocorrer através da ação da enzima quimase, sendo que esta enzima sofre um *upregulation* no rim isquêmico, clipado, na hipertensão renovascular e essa regulação parece ser gerada pela própria isquemia (Sadjadi e cols., 2005b).

A fase inicial da hipertensão após colocação do clipe parece ser dependente do aumento na concentração plasmática de renina e de Ang II. Já na fase de manutenção da hipertensão, que inicia após aproximadamente quatro semanas após a colocação do clipe, os níveis plasmáticos de Ang II e renina retornam aos seus níveis normais; o fluxo sanguíneo para o rim contralateral não clipado aumenta e os níveis de renina são depletados. Por mecanismos ainda não totalmente compreendidos, o rim não-estenótico, mantém níveis elevados de Ang II e retém sódio e água mesmo com níveis depletados de renina. Essa resposta diferenciada do rim não estenótico é conhecida como o “mistério de Goldblatt” e acredita-se ser de grande importância na manutenção dos altos níveis de PA desse modelo 2R1C (Navar e cols., 1998; Guan e cols., 1992; Sadjadi e cols., 2002).

As injúrias nos órgãos-alvo que ocorrem no modelo 2R1C são dependentes do grau da estenose e usualmente incluem disfunção endotelial, hipertrofia cardíaca (de 20 a 50 % de aumento no tamanho do coração) e hipertrofia do rim contralateral exposto à hipertensão (Akabane e cols., 1985 e Pinto e cols., 1998, Rodrigues e cols., 2007; Cangussu e cols., 2009 e Soares e cols., 2011).

O controle da PA ocorre através de mecanismos complexos que envolvem o sistema nervoso, renal e diversos mecanismos hormonais, em curto e em longo prazo (Guyton, 1985 e Constanzo, 1999).

O barorreflexo é o principal mecanismo sobre o qual o sistema nervoso central regula a PA em curto prazo. As fibras dos nervos aórticos e carotídeos, que trafegam a partir dos nervos glossoríngeo e vago, convergem para região do núcleo do trato solitário (NTS), considerado então a primeira estação central dos sinais sensoriais originados do sistema periférico. A partir do NTS, os neurônios se projetam para o bulbo ventrolateral (VLM) caudal (CVLM), o qual promove uma inibição sobre a região simpatoexcitatória do VLM rostral (RVLM), através de uma via neuronal ascendente. Os neurônios RVLM se projetam para os neurônios pré-ganglionares do sistema nervoso simpático (SNS) localizados na coluna intermediolateral da medula espinhal. Existe uma conexão entre a CVLM e o núcleo ambíguo (NA) e o motor do vago, permitindo a essa área modular a frequência cardíaca (FC), através do sistema nervoso parassimpático (SNP). Resumindo, o reflexo pressorreceptor participa da manutenção dos níveis normais de PA, principalmente por controlar o tônus simpático e parassimpático para coração e vasos (McKittrick e Caleresu, 1997 e Campagnole-Santos e Haibara, 2001).

Já está bem estabelecido na literatura que tanto animais quanto pacientes com hipertensão apresentam atenuação importante da sensibilidade barorreflexa da FC (McCubbin, Green e Page, 1956; Eckberg, 1979 e Korner e cols., 1974), além disso, o grau de atenuação do barorreflexo tem forte correlação com a severidade da hipertensão (Campagnole-Santos e Haibara, 2001).

O SRA é um sistema de controle da PA em longo prazo, amplamente estudado e bem caracterizado na literatura exercendo influência na regulação da PA, no controle do balanço hidroeletrólítico, no metabolismo intermediário, na hemodinâmica regional de órgãos como o coração, rins e vasos sanguíneos (Kusserow e Unger, 2004). Em uma visão clássica, o SRA é considerado como um sistema unicamente hormonal, tendo como principal efector a Ang II, sendo que essa é produzida exclusivamente no sangue e depois distribuída aos órgãos e tecidos. Esse conceito clássico sofreu modificações, dessa forma, atualmente, além da Ang II considera-se que outros peptídeos tais como a Angiotensina III, Angiotensina IV e Ang-(1-7) desempenham uma variedade de ações biológicas (Ferrario, 1990, Santos e Campagnole, 1994 e Santos e cols., 2000).

A formação dos peptídeos angiotensinérgicos ocorre por um processo de proteólise iniciada pela hidrólise do angiotensinogênio pela renina. A renina cliva o angiotensinogênio produzido no fígado, formando o decapeptídeo Angiotensina I (Ang I), que é posteriormente processado pela enzima conversora da angiotensina (ECA) formando o octapeptídeo Ang II. Por sua vez, ambas, Ang I e Ang II podem ser processadas dando origem a outros peptídeos bioativos menores como a Ang-(1-7) (Figura 1) (Ferrario e cols., 2005). A Ang-(1-7) pode ser formada diretamente pela Ang I através das enzimas endopeptidase neutra (NEP) e prolil-endopeptidase (PEP) ou através da Ang II pela ação das enzimas ECA2, NEP e carboxipeptidase (PCP). Indiretamente a Ang-(1-7) pode ser formada pela Ang I tendo como um passo intermediário a Ang-(1-9) através da hidrólise da ECA e NEP (Santos e Campagnole-Santos, 2000; Vickers e cols., 2002; Zisman e cols., 2003) (Figura 1).

As ações da Ang II e dos demais peptídeos angiotensinérgicos são mediadas por múltiplos receptores localizados na membrana plasmática de células alvo e em várias espécies. Atualmente, reconhece-se a existência de dois subtipos de receptores para a Ang II, o receptor AT₁ e o AT₂, sendo o primeiro o responsável pela maioria dos efeitos cardiovasculares que podem levar a hipertensão (Kaschina e Unger, 2003; Kusserow e Unger, 2004). A Ang II através de sua interação com o receptor AT₁ promove ações proliferativas e pró-fibróticas, além de vasoconstrição, ativação do nervo simpático, liberação de aldosterona e retenção de sódio e água (Suzuki e cols., 1993; Obayashi e cols., 1997; Gasparo e cols., 2000). Já os receptores AT₂ apesar de serem amplamente distribuídos no período fetal e neonatal, eles apresentam um papel importante também no indivíduo adulto, mediando ações da Ang II em estados patológicos (Gasparo e cols., 2000, Gallinat e cols., 2000). As ações da Ang II ao se ligar ao receptor AT₂ como apoptose celular, reparo tecidual e vasodilatação são frequentemente opostas às ações da Ang II ao se ligar ao receptor AT₁ (Gasparo e cols., 2000; Kusserow e Unger, 2004).

A descoberta da enzima ECA2 em 2000 (Donoghue e cols., 2000), possibilitou a visualização de outro eixo distinto de formação de peptídeos, reforçando o papel da Ang-(1-7) como um importante efetor do SRA. A ECA2 é uma enzima homóloga à ECA, possuindo aproximadamente 40% de homologia com essa enzima (Tipnis, Hooper e cols., 2000). A distinção entre as duas enzimas é comprovada pelo fato de que a ECA2 não ser inibida pelos inibidores clássicos da ECA (captopril, lisinopril e enalapril) (Donoghue e cols., 2000 e Tipnis, Hooper e cols., 2000).

O heptapeptídeo Ang-(1-7) possui afinidade muito baixa para os receptores AT₁ e AT₂ (Santos, Campagnole-Santos, 2000), dificultando atribuir suas ações à ligação com esses receptores. O receptor Mas foi identificado como sítio de ligação funcional para a Ang-(1-7) (Santos e cols. 2003; Tallant e cols., 2005). Santos e colaboradores demonstraram que a deleção genética do receptor Mas acoplada a proteína G aboliu a ligação da Ang-(1-7) nos rins de camundongos, além de bloquear a ação antidiurética da Ang-(1-7) após sobrecarga hídrica e a resposta vasodilatadora induzida pela Ang-(1-7) na aorta (Santos e cols., 2003). Tallant e colaboradores (2005) mostraram que a Ang-(1-7) através da ativação do receptor Mas inibe a síntese protéica em cardiomiócitos. Esses resultados caracterizaram o Mas como o receptor funcional da Ang-(1-7), provendo uma base ainda mais clara para o entendimento das ações fisiológicas da Ang-(1-7).

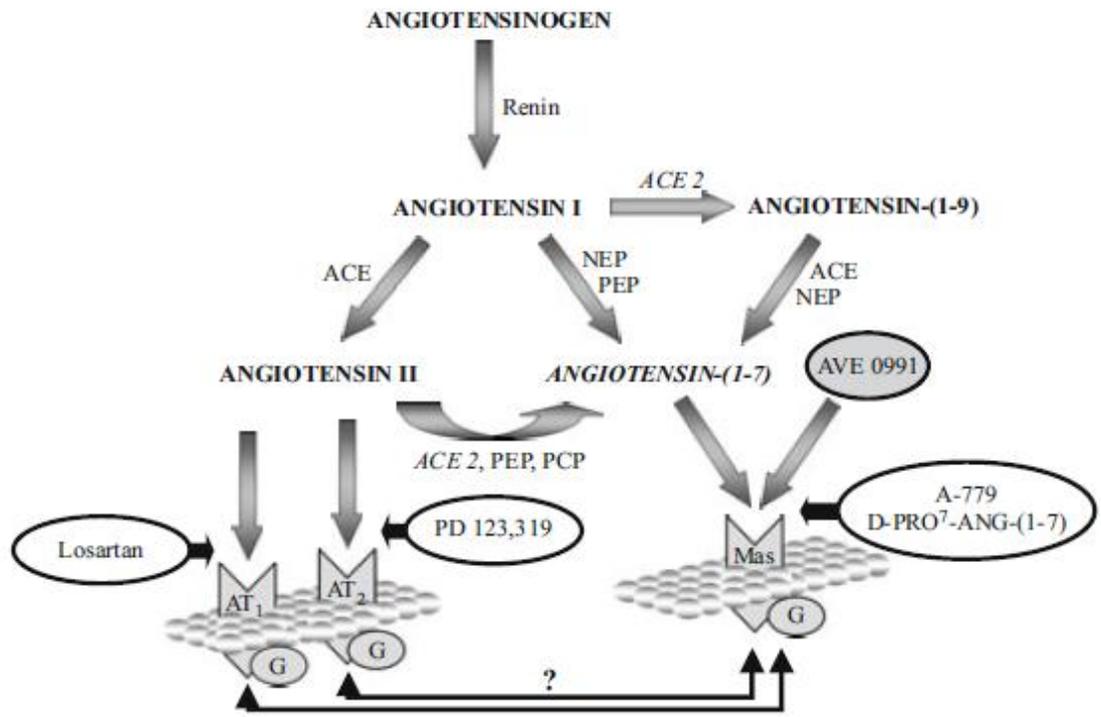


Figura 1: Cascata simplificada do SRA com foco nas vias de formação da Ang-(1-7) O composto AVE 0991 liga ao receptor Mas que é bloqueado pelo A-779 e D-Pro⁷-Ang-(1-7). Receptor Mas pode formar heterodímeros com receptores AT₁ e AT₂. ECA, enzima conversora da angiotensina; AT₁, receptor da Ang II tipo 1; AT₂, receptor da Ang II, tipo 2; A-779, antagonista do receptor Mas; D-Pro⁷-Ang-(1-7), antagonista do receptor Mas; G, proteína G; Mas, receptor Mas da Ang-(1-7); Nep, endopeptidase neutra; PCP; prolilcarboxipeptidase; PD 123,319, antagonista de AT₂; PEP, prolilendopetidase (Adaptado de Santos e Ferreira, 2006).

Muitos estudos têm demonstrado que a Ang-(1-7) exerce importantes funções biológicas no coração e vasos sanguíneos, como potenciação do efeito da bradicinina (Oliveira e cols., 1999; Paula e cols., 1995), liberação de óxido nítrico (Seyedi e cols., 1995, Li e cols., 1997 e Faria-Silva, 2005), vasodilatação (Benter e cols., 1993; Benter e cols., 1995) e inibição do crescimento celular (Freeman e cols. 1996), além de possuir um perfil anti-trófico e antifibrótico (Santos e cols., 2003; Tallant e cols. 2005) e participação na regulação da PA (Benter e cols., 1995 e Ferrario e cols., 2003); e regulação do barorreflexo (Santos e Campagnole, 2000).

Iyer e colaboradores (1998) mostraram que o bloqueio agudo da formação da Ang-(1-7) com dois diferentes inibidores da neprilysina, uma enzima que forma Ang-(1-7) a partir da Ang I, reverte os efeitos hipotensores do tratamento combinado com lisinopril (inibidor da ECA) e losartan (antagonista do receptor AT₁) em ratos espontaneamente hipertensos (SHR), sugerindo que, pelo menos em parte, os efeitos induzidos por esses bloqueios podem ser mediados pela Ang-(1-7) (Iyer e cols., 1998). Além disso, os níveis circulantes e de excreção urinária da Ang-(1-7) estão diminuídos na presença da hipertensão essencial ou renovascular na infância (Simões e Silva e cols., 2004). Iwata e colaboradores (2005) investigaram os efeitos da Ang-(1-7) em fibroblastos cardíacos de ratos adultos e observaram efeitos inibitórios sobre a síntese de colágeno e redução da expressão do mRNA de fatores de crescimento nos fibroblastos cardíacos de ratos adultos, sugerindo um importante papel da Ang-(1-7) na regulação do remodelamento cardíaco (Iwata e cols., 2005). Além disso, Benter e colaboradores (1995) avaliaram em ratos SHR que a infusão de Ang-(1-7) (24 µg.kg⁻¹.h⁻¹, durante duas semanas) induziu uma melhora de 35% na sensibilidade do controle reflexo da FC que foi similar a encontrada nos animais controle (WKY não tratados).

De maneira semelhante a outros peptídeos, a Ang-(1-7) pode sofrer degradação no trato gastrointestinal (Marques e cols., 2011). Um importante avanço nos estudos relacionados às ações da Ang-(1-7) e suas possíveis aplicações farmacológicas foi a descoberta de seu análogo AVE 0991 (Wiemer e cols., 2002). O composto AVE 0991 é um derivado imidazólico substituído que tem peso molecular 580,73 e é solúvel em substâncias aquosas alcalinas ou em solventes orgânicos. Este composto é um agonista do receptor Mas, não peptídico e oralmente ativo que mimetiza os efeitos dessa angiotensina em muitos tecidos (Santos e Ferreira, 2006).

Em células endoteliais aórticas bovinas, o AVE 0991 compete pelos sítios de ligação da Ang-(1-7) e libera óxido nítrico/ superóxido com perfil similar ao observado para a Ang-

(1-7) (Wiemer e cols., 2002). Outros estudos têm demonstrado que o AVE 0991 age como um agonista do receptor Mas no rim (Pinheiro e cols., 2004), nos vasos sanguíneos (Lemos e cols., 2005) e que funciona similarmente à Ang-(1-7) no coração. Também foi demonstrado que o tratamento com AVE 0991 induz prevenção de danos em órgãos-alvo em ratos espontaneamente hipertensos (SHR) tratados com L-NAME (Benter e cols., 2006). Ferreira e colaboradores (2007) mostraram que o tratamento com AVE 0991 tem efeito cardioprotetor sobre o remodelamento cardíaco induzido pelo isoproterenol. Mais recentemente foi demonstrado que AVE 0991 também preveniu hipertrofia miocárdica induzida pela Ang II em um processo associado à inibição da sinalização de TGF- β 1/Smad2 (He e cols., 2010). Toton-Zuranska e colaboradores (2010) demonstraram que o tratamento com AVE 0991 por quatro meses (0,58 μ mol/kg/dia, via ração) reduziu a progressão da aterosclerose em um modelo experimental em ratos com deleção genética para a apolipoproteína E. Wuo-Tao-Zeng e colaboradores (2010) demonstraram que o tratamento com AVE 0991 (1 mg/kg/dia) por quatro semanas melhorou a função cardíaca e atenuou o remodelamento ventricular em ratos com infarto do miocárdio, sendo que essa ação pode estar envolvida com a inibição da sobre-expressão de marcadores inflamatórios como TGF- β 1/TNF- α e a ação do receptor Mas.

Compostos não peptídicos são importantes na terapia farmacológica devido à sua resistência a ação de enzimas proteolíticas, oferecendo com isso, a possibilidade de administração oral. Um crescente número de estudos sugere que componentes capazes de interferir no eixo ECA2-Ang-(1-7)-Mas podem constituir uma nova classe de medicamentos para o tratamento de doenças cardiovasculares. Dessa forma, o AVE 0991 se torna um candidato promissor nas terapias de doenças renovasculares (Santos e cols., 2006).

Diante dessas considerações, o objetivo deste presente estudo foi avaliar o efeito da administração intragástrica, por gavagem, de AVE0991 sobre a pressão arterial, frequência cardíaca, sensibilidade do controle reflexo da FC e no remodelamento cardíaco em ratos acordados com hipertensão renovascular 2R1C.

3 Objetivos

3.1 Objetivo geral

O objetivo geral do presente estudo foi avaliar o efeito da administração intragástrica de AVE0991 sobre parâmetros cardiovasculares, bem como sobre aspectos histológicos cardíacos e renais em ratos com hipertensão renovascular.

3.2 Objetivos específicos

- Avaliar o efeito do tratamento intragástrico com AVE 0991 nas doses 1 e 3 mg/kg, sobre a PAM e FC basais nos ratos 2R1C e SHAM;
- Avaliar a sensibilidade do controle reflexo da FC em animais 2R1C e SHAM submetidos ao tratamento intragástrico com AVE 0991 nas doses 1 e 3 mg/kg;
- Comparar o peso úmido relativo do coração dos ratos 2R1C e SHAM submetidos ao tratamento intragástrico com AVE 0991 nas doses 1 e 3 mg/kg;
- Comparar o peso úmido relativo dos rins clipados e não clipados, assim como a porcentagem de redução do rim clipado em relação ao rim não clipado, nos ratos 2R1C e SHAM submetidos ao tratamento intragástrico com AVE 0991 nas doses 1 e 3 mg/kg;
- Avaliar as alterações histológicas observadas no ventrículo esquerdo e nos rins dos animais 2R1C e SHAM, submetidos ao tratamento intragástrico com AVE 0991 nas doses 1 e 3 mg/kg;

4 Materiais e métodos

4.1 Animais

Foram utilizados ratos Fischer machos (150-200g) provenientes do Laboratório de Nutrição Experimental da UFOP. Os animais foram armazenados em caixas de plástico, quatro por caixa, com livre acesso a água e ração comercial para roedores, mantidos em ambiente com ciclo claro/escuro de 12hs, em uma temperatura de média de 21° C. Todos os procedimentos experimentais foram aprovados pela comissão de Ética no uso de animais da UFOP (protocolo número: 2010/55).

4.2 Protocolo experimental

Os animais foram divididos em 6 grupos de 5-10 animais cada, a saber:

- Grupo SHAM KOH : ratos SHAM tratados com o veículo KOH
- Grupo 2R1C KOH: ratos 2R1C tratados com o veículo KOH
- Grupo SHAM AVE 0991 1 mg: ratos SHAM tratados com AVE 0991 (1 mg/kg)
- Grupo 2R1C AVE 1 mg: ratos 2R1C tratados com AVE 0991 (1 mg/kg)
- Grupo SHAM AVE 3 mg: ratos SHAM tratados com AVE 0991 (3 mg/kg)
- Grupo 2R1C AVE 3 mg: ratos 2R1C tratados com AVE 0991 (3 mg/kg)

Um modelo esquemático das etapas do experimento está representado na figura 2. Inicialmente foi realizada a cirurgia para a produção da hipertensão renal (2R1C) ou cirurgia fictícia (SHAM). Após três dias da cirurgia (2R1C ou SHAM), iniciou-se a administração diária intragástrica de AVE 0991 nas dosagens de 1 mg/kg ou 3 mg/kg ou do veículo (KOH) pelo período de 28 dias. No 28º dia, os animais foram anestesiados e tiveram sua artéria aorta abdominal e veia femoral canuladas para registro após 24 horas dos parâmetros cardíacos. Ao término dos experimentos, o animal foi eutanaziado e foi feita a retirada dos órgãos para posterior análise histológica.

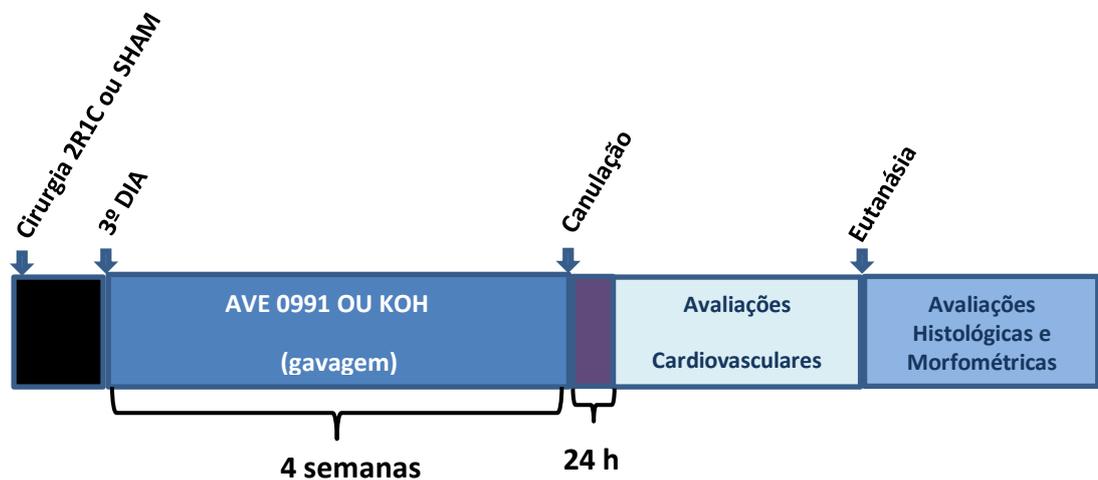


Figura 2: Modelo temporal do plano experimental de trabalho.

4.3 Anestesia

Para produção da hipertensão renovascular e para canulação da artéria abdominal e veia femoral foi utilizada a mistura anestésica de quetamina (Syntec do Brasil Ltda) na dose de 50 mg/ kg, *ip*, e xilazina (Divisão Vetbrands Saúde Animal) na dose de 5 mg/ kg, *ip*.

4.4 Cirurgia para produção da hipertensão renovascular

Para produção da hipertensão arterial foi utilizado o modelo experimental 2 rins 1 clipe (2R1C), descrito por Goldblatt e colaboradores (1934). Os animais (150 – 200g) foram submetidos a jejum de 24 horas, com livre acesso à água. No dia da cirurgia, sob anestesia por quetamina e xilazina (50 mg/ kg e 05 mg/ kg, ip, respectivamente) os animais foram colocados em decúbito dorsal em uma prancha cirúrgica, e submetidos à tricotomia e assepsia da região abdominal. A seguir, foi realizada uma laparotomia mediana para isolamento e visualização da artéria renal esquerda. Um clipe de prata (contendo 5% de cobre e ótimo grau de dureza) com 8 mm de comprimento e 2 mm de largura, em forma de U, foi colocado ao redor da artéria renal. O grau de constrição interna do clipe foi previamente fixado em 0,20 mm de diâmetro interno através de um calibrador, de acordo com Rodrigues e colaboradores (2007), que mostraram que este grau de constrição proporciona maior índice de obtenção de PA acima de 130 mmHg (nível de pressão escolhida para selecionar os animais hipertensos). O abdômen foi então suturado com pontos contínuos, envolvendo a camada muscular e a pele. Ao final dos procedimentos cirúrgicos, uma dose de 1 ml/kg do peso corporal de rato de antibiótico foi administrada em todos os animais (pentabiótico veterinário – pequeno porte/ FORT DODGE Saúde Animal Ltda. Indústria Brasileira).

Outros animais foram submetidos à cirurgia fictícia (SHAM), que consistiu na realização de todos os procedimentos acima, exceto a colocação do clipe de prata na artéria renal. Estes animais foram utilizados como controle.

4.5 Preparação dos fármacos

AVE 0991 (1 mg/kg) - para o tratamento com AVE 0991 na dose 1 mg/Kg, foi preparada uma solução estoque de 10 mg de AVE 0991 em 1 ml de KOH 10 mM. Dessa solução foram obtidas alíquotas de 0,1ml em tubos de polietileno Eppendorf® que permaneceram congeladas até o momento do uso. Em cada alíquota, foi adicionado 900µL de água destilada.

AVE 0991 (3 mg/kg) - para o tratamento com AVE 0991 na dose 3 mg/Kg, foi preparada uma solução estoque de 30 mg de AVE 0991 em 1 ml de KOH 10 mM. Dessa solução foram obtidas alíquotas de 0,1ml em tubos de polietileno Eppendorf® que permaneceram congeladas até o momento do uso. Em cada alíquota, foi adicionado 900µL de água destilada.

KOH (veículo) - para o grupo controle, 1 ml de KOH 10 mM foi adicionado a 9 ml de água destilada.

4.6 Tratamento intragástrico com AVE 0991 ou veículo KOH

Após três dias das cirurgias (2R1C/ SHAM), foi realizada a administração intragástrica do AVE 0991 dose 1 mg/kg ou 3 mg/kg, ou do veículo KOH, utilizando agulha de gavagem, diariamente, respeitando sempre o mesmo horário, durante 28 dias. Os animais receberam em torno de 0,2 ml de solução AVE 0991 (1 ou 3 mg/kg) ou veículo (KOH).

4.7 Confeção das Cânulas

Para a confecção das cânulas foram utilizados tubos de polietileno PE-50 polimerizadas a tubos de polietileno PE-10. A PE-50 possuía o comprimento de 15 cm e a PE-10 o comprimento de 4 cm para artéria e 2 cm para a veia. Antes das canulações, o interior da cânula foi lavado com salina e preenchido com heparina sódica (Hipolabor Farmacêutica - 5000 U.I/ml) na concentração de 10%, a extremidade livre da PE-50 foi, então, obstruída com pino de metal.

4.8 Canulação da Artéria Aorta Abdominal e Veia Femoral

Os animais foram colocados em decúbito dorsal em uma prancha cirúrgica. Realizou-se uma pequena incisão na pele, separando a musculatura para localização do feixe vâsculo-nervoso femoral. Artérias e veia femorais foram dissecadas e expostas. As cânulas foram introduzidas na aorta abdominal, via artéria femoral, para registro dos parâmetros cardiovasculares e na veia cava inferior através da veia femoral, para administração de drogas. A seguir foram amarradas junto ao feixe com fio cirúrgico. As extremidades das cânulas foram dirigidas ao dorso do animal e exteriorizadas na região interescapular, através de um trocater, permitindo livre movimentação. Ao final, foi realizada sutura contínua no local da incisão.

Após a cirurgia, os animais foram acondicionados em gaiolas individuais, por 24 horas, para sua recuperação, com livre acesso a água e ração, sob condições ideais de temperatura, níveis de ruído e luminosidade.

Todos os experimentos foram realizados em animais acordados, com livre movimentação, dentro de uma gaiola apropriada para a realização dos testes.

4.9 Avaliações Cardiovasculares

4.9.1 Registro da Pressão Arterial

A avaliação da PAM e FC foi realizada pelo registro direto da PA através da canulação da artéria femoral dos ratos acopladas ao sistema computadorizado de aquisição de dados (Powerlab 4/ 30).

A PA foi monitorada por um transdutor de pressão modelo *Gould* conectado a um amplificador (ML221 *Bridge Amp*). A pressão arterial pulsátil (PAP) e FC foram continuamente amostradas por um sistema de conversão analógico/digital de 16 bits (Powerlab 4/30) a uma frequência amostral de 100 Hz e armazenados em disco rígido (PC). A amplitude do range foi previamente definida em 20 mV. Posteriormente, o sinal foi processado por um software (Lab Chart 7) para se obter a PAM, as características temporais e

as alterações máximas dos parâmetros desejados. PAM e FC foram derivados em tempo real à partir de pulsos de PAP, utilizando o software Chart 5. Essas variáveis foram apresentadas simultaneamente em canais distintos no monitor e armazenadas no disco rígido do computador.

4.9.2 Teste da Sensibilidade do Controle Reflexo da FC

A sensibilidade do reflexo da FC foi avaliada relacionando-se as alterações reflexas de FC induzidas por alterações transitórias da PAM. Para produzir alterações pressoras da PAM, os animais foram submetidos à injeção (em bolus) endovenosa (0,1 ml) de doses crescentes de fenilefrina (Sigma Chemical Co, USA) que variaram de 0,5 a 40,0 µg. E para produzir alterações depressoras da PAM, os animais foram submetidos a injeções endovenosas (0,1 ml em bolus) de doses crescentes de nitroprussiato de sódio (Proquimios Comércio e Indústria Ltda.) de 0,5 a 1µg. Em ambas as drogas, as doses foram realizadas de maneira a se obter respostas de 10, 20, 30 e 40 mmHg, pressoras ou depressoras, respectivamente. Um intervalo mínimo de dois minutos foi mantido entre as injeções da mesma droga, para permitir que a PAM e FC retornassem aos valores basais. Os testes da bradicardia reflexa (fenilefrina) ou da taquicardia (nitroprussiato de sódio) foi aleatória, respeitando sempre um intervalo de 15 minutos entre elas.

As alterações de FC verificadas durante as respostas pressora e depressora foram convertida a intervalo de pulso (IP) pela fórmula $IP=60000/FC$ (mseg). A sensibilidade do controle reflexo da FC foram expressas pela razão entre a alteração da FC em intervalo de pulso (mseg) e a alteração da PAM (mmHg), que denominamos “índice da sensibilidade do reflexo”. O teste do controle reflexo da FC, componente bradicárdico e taquicárdico (controle da FC) foi avaliado em cada rato.

4.9.3 Coleta de órgãos e análise histológica

Após o término do experimento os animais foram anestesiados, posteriormente, sacrificados por decapitação e submetidos a laparotomia mediana para ressecção dos tecidos. Foram coletados rins e coração, sendo que nesse último, foi realizada a dissecação do ventrículo esquerdo. Foi considerado no estudo o peso úmido total do coração, do ventrículo esquerdo, e dos rins, direito e esquerdo.

Para a análise histológica, ventrículo esquerdo e rins foram fixados em formalina e processados por técnicas histopatológicas de rotina. Estes órgãos foram desidratados, diafanizados, embebidos e emblocados em parafina. Secções parafinadas de aproximadamente quatro micrômetros de espessura foram obtidas através de um micrótomo, fixadas em lâminas de vidro tratadas com albumina e coradas com Hematoxilina/eosina (HE) para avaliação de alterações morfológicas. O mesmo procedimento foi realizado para o Tricrômico de Masson, para a detecção de colágeno intersticial e perivascular.

Foram realizadas avaliações quantitativas em ambos os métodos de coloração. Para isso, foram obtidas imagens aleatórias dos tecidos corados com HE e Tricrômico de Masson no microscópio Leica BM5000 com câmera digital (Leica DFC 300 FX) acoplada com módulo RGB ativada e associada ao *software* de captura de imagens Leica Application Suite em objetiva microscópica de 40 vezes. As imagens foram analisadas no *software* Leica Qwin V.3.2.1 (Leica Switzerland). No coração foi avaliada a espessura das fibras miocárdicas através de medidas interativas na região correspondente ao núcleos. Somente fibras com núcleos e limites celulares visíveis foram incluídas. Cinquenta a cem cardiomiócitos foram analisados para cada animal. Para a determinação da presença de células inflamatórias, tanto no coração quanto nos rins, foi realizada a contagem automática do número total de células presentes em 20 campos, fotografados aleatoriamente; um número de células diferente do grupo SHAM controle, representaria uma menor ou maior intensidade de inflamação. Essas análises foram realizadas em cortes histológicos corados por HE.

5 Resultados

5.1 Avaliação dos Parâmetros Cardiovasculares

5.1.1 Níveis basais de PAM e FC

A figura 3 representa os níveis basais de PAM e FC dos animais normotensos SHAM ou hipertensos 2R1C, dos grupos controle (veículo KOH) ou tratados com AVE 0991 na dose de 1 mg/kg ou 3 mg/kg.

A PAM basal dos ratos 2R1C KOH ($160,2 \pm 5,2$ mmHg, n=14) foi maior ($p < 0,05$) em relação à PAM basal dos ratos SHAM KOH ($99,94 \pm 2,6$ mmHg, n=12). Os ratos 2R1C AVE 1 mg (n=7) também apresentaram valores basais de PAM superiores ($p < 0,05$) à do grupo SHAM AVE 1 mg (n=7) e similares aos encontrados nos ratos 2R1C KOH (n=7) ($p > 0,05$) (Figura 3 , painel A e Tabela 1). Entretanto, no tratamento com AVE 3 mg, a PAM basal dos ratos 2R1C AVE 3 mg (n=9) foi inferior ($p < 0,05$) em relação à PAM dos ratos do grupo 2R1C KOH (n=7). Apesar da redução dos níveis de PAM induzido pelo AVE 3 mg nos ratos 2R1C, a PAM basal dos ratos 2R1C AVE 3 mg foi superior ($p < 0,05$) em comparação à PAM basal do grupo SHAM AVE 3 mg (n=6) (Figura 3 , painel B e Tabela 1).

O tratamento com AVE nas doses de 1 e 3 mg/kg não alterou os valores de PAM dos animais SHAM AVE (n=5-7) em relação aos animais SHAM (n=7) (Figura 3, tabela 1).

Os valores basais de FC não variaram entre os grupos 2R1C ou SHAM tratados com KOH ou AVE 0991 nas doses 1 mg/kg ou 3 mg/kg (Figura 3 , painéis C e D e Tabela 1).

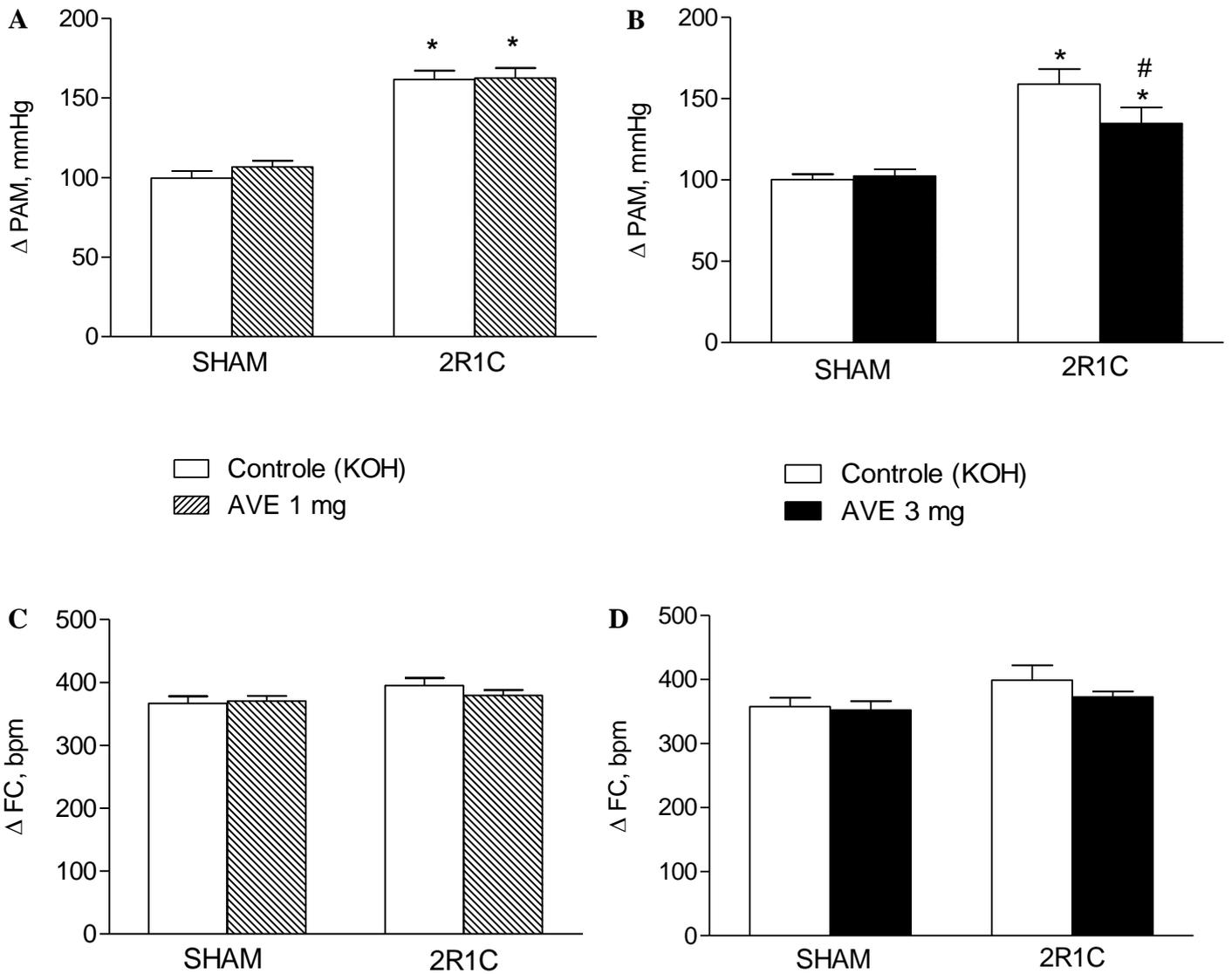


Figura 3: Valores basais de pressão arterial média (PAM, mmHg, painel A e B) e frequência cardíaca (FC, bpm, painel C e D) em ratos SHAM (n=5-7) e 2R1C (n=7-9) submetidos a tratamento intragástrico, por 28 dias com KOH ou AVE 0991 nas doses de 1 mg/kg ou 3 mg/kg. * p<0,05 em comparação com os animais SHAM KOH. # p<0,05 em comparação aos animais 2R1C KOH (ANOVA seguida de Newman Keuls).

Tabela 01: Valores de PAM e FC dos animais normotensos SHAM ou hipertensos 2R1C tratados com KOH (controle) ou tratados com AVE 0991 nas doses de 1 mg/kg ou 3 mg/kg

		PAM (mmHg)	FC (bpm)
SHAM (n= 5-7)	KOH	99,56 ± 4,5	366,8 ± 11,2
	AVE 1 mg	106,7 ± 3,7	370 ± 8,3
SHAM (n=7)	KOH	97,52 ± 3,38	357 ± 13,46
	AVE 3 mg	102,5 ± 4,1	352,5 ± 13,64
2R1C (n=7)	KOH	161,6 ± 5,4*	399,1 ± 23,1
	AVE 1 mg	162,4 ± 6,3*	379,3 ± 8,4
2R1C (n= 8-9)	KOH	159,9 ± 9,4*	399 ± 23,12
	AVE 3 mg	134,8 ± 9,7*#	372,5 ± 8,7

Valores expressos em média ± erro padrão da média. * p<0,05 em comparação aos animais SHAM KOH. # p<0,05 em comparação aos animais 2R1C KOH (ANOVA seguida de Newman Keuls).

5.2.2 Avaliação da Bradicardia Reflexa

A sensibilidade da bradicardia reflexa de todos os animais 2R1C KOH ($0,5812 \pm 0,14$ ms/mmHg, n=15) foi menor ($p < 0,05$) em relação a sensibilidade da bradicardia reflexa de todos os animais SHAM KOH ($1,029 \pm 0,053$ ms/mmHg, n=12).

Em relação ao tratamento com AVE 1 mg, a sensibilidade da bradicardia reflexa nos ratos com hipertensão 2R1C AVE 1 mg (n=7) foi menor ($p < 0,05$) em relação à bradicardia reflexa do grupo SHAM AVE 1 mg (n=5) (Figura 3, Painel A e Tabela 2). Além disso, os animais hipertensos 2R1C KOH (n=7) e 2R1C AVE 1 mg (n=7) apresentaram valores similares da sensibilidade da bradicardia reflexa ($p > 0,05$) (Figura 4., Painel A e Tabela 2).

A avaliação do componente bradicárdico do controle reflexo da FC do ratos SHAM tratados com AVE 0991 1 mg foram similares ($p > 0,05$) a bradicardia reflexa dos ratos do grupo SHAM KOH (Figura 4., Painel A e Tabela 2).

De forma similar ao tratamento com AVE 1 mg, o tratamento com AVE 3 mg mostrou que os valores de bradicardia reflexa dos animais SHAM KOH (n=7) foram similares ($p > 0,05$) em relação aos valores do grupo SHAM AVE 3 mg (n=7) (Figura 4, Painel B e Tabela 2). Entretanto, os animais 2R1C tratados com AVE 3 mg (n=9) apresentaram a sensibilidade da bradicardia reflexa maior ($p < 0,05$) em relação aos ratos 2R1C KOH (n=8) e semelhantes ($p > 0,05$) aos ratos dos grupos SHAM AVE 3 mg (Figura 4, Painel B e Tabela 2).

Bradycardia Reflexa

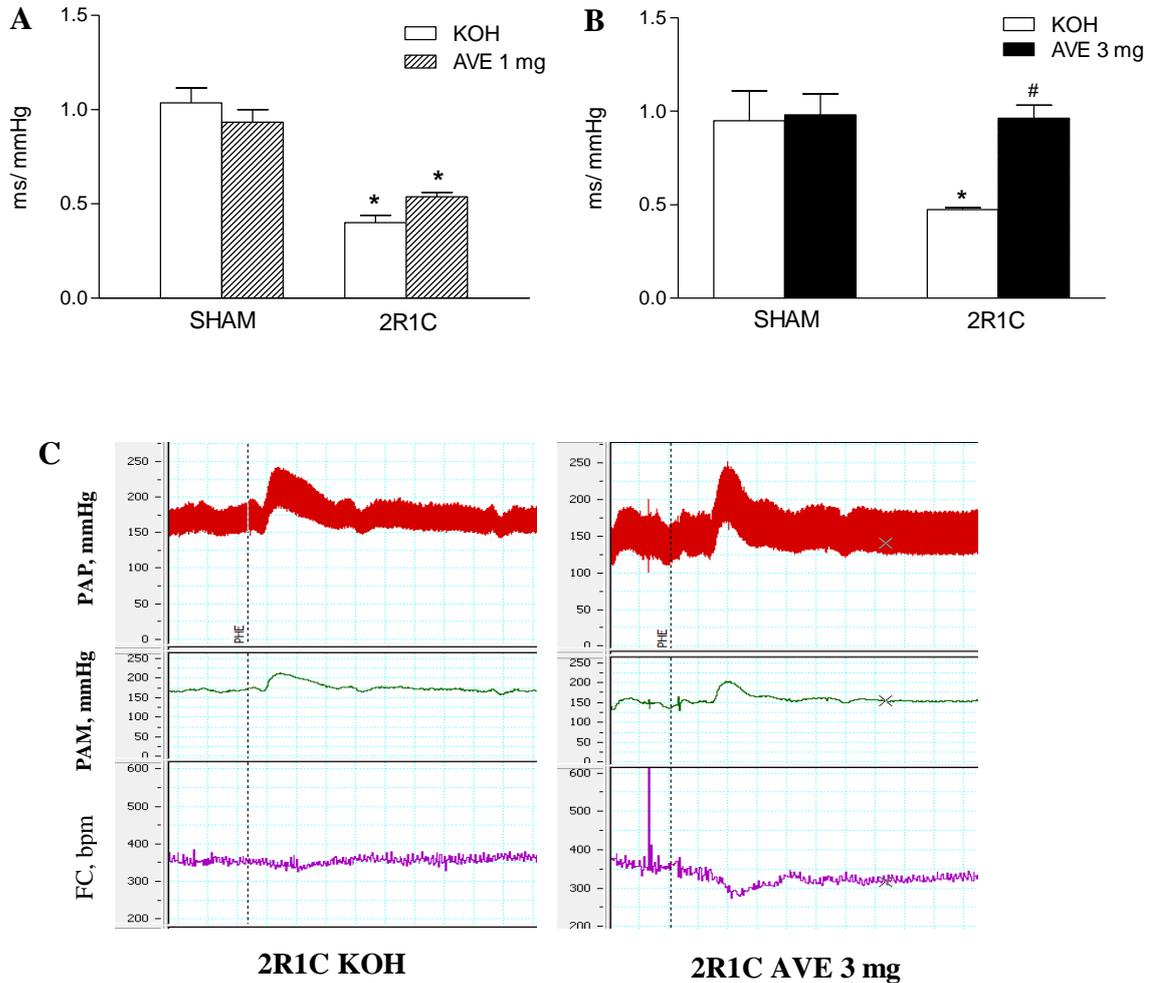


Figura 4: Alterações reflexas na FC (expressas em intervalo de pulso, IP, ms) em resposta a variação na pressão arterial média (PAM, mmHg) produzidas por doses crescentes de fenilefrina (0,25 a 5 μ g, iv) em ratos SHAM (n=5-7) ou 2R1C (n=7-9) tratados com o veículo KOH ou com AVE 0991 na concentração de 1 mg/kg ou 3 mg/kg. Painéis **A** e **B** mostram o índice da sensibilidade barorreflexa (ms/ mmHg) obtido através do *slope* da regressão linear. Painel **C** mostra a pressão arterial pulsátil (PAP, mmHg), pressão arterial média (PAM, mmHg) e frequência cardíaca (FC, bpm) ilustrando o efeito típico de injeção de fenilefrina (0,5 a 40,0 μ g, i.v.) em um rato 2R1C KOH e um rato 2R1C AVE 3 mg. As linhas tracejadas representam o momento das injeções de fenilefrina (40,0 μ g, in bolus). *p< 0,05 em comparação ao grupo SHAM. #p< 0,05 em comparação a 2R1C KOH (ANOVA seguido por Newman-Keuls).

Tabela 02: Sensibilidade da bradicardia reflexa, expressa pela relação $\Delta IP / \Delta PAM$, em animais normotensos SHAM ou hipertensos 2R1C tratados com KOH (controle) ou tratados com AVE 0991 na concentração de 1 mg/kg ou 3 mg/kg

		Bradicardia Reflexa (ms/mmHg)
SHAM (n= 5-7)	KOH	1,03 ± 0,079
	AVE 1 mg	0,93 ± 0,068
SHAM (n=7)	KOH	1,01 ± 0,06
	AVE 3 mg	0,91 ± 0,12
2R1C (n=7)	KOH	0,4 ± 0,04 *
	AVE 1 mg	0,53 ± 0,22*
2R1C (n= 8-9)	KOH	0,5 ± 0,1*
	AVE 3 mg	0,8 ± 0,09 #

Valores expressos em média ± erro padrão da média. * $p < 0,05$ em comparação aos animais SHAM KOH. # $p < 0,05$ em comparação aos animais 2R1C KOH (ANOVA seguida de Newman Keuls).

5.2.3 Avaliação da Taquicardia Reflexa

A sensibilidade da taquicardia reflexa de todos os animais 2R1C KOH ($0,54 \pm 0,012$ ms/mmHg, n=15) foi menor ($p < 0,05$) em relação a sensibilidade da taquicardia reflexa do grupo SHAM KOH ($1,011 \pm 0,04$ ms/mmHg, n=12).

Os tratamentos com AVE nas doses de 1 e 3mg/kg melhoraram a sensibilidade da taquicardia reflexa nos ratos com hipertensão 2R1C. Os animais 2R1C AVE 1 mg (n=7) apresentaram valores semelhantes ($p > 0,05$) ao grupo SHAM AVE 1 mg (n=5) e superiores ($p < 0,05$) ao grupo 2R1C KOH (Figura 5, painel A, Tabela 3). Da mesma forma, o grupo 2R1C AVE 3 mg (n=9) apresentou valores da sensibilidade da taquicardia reflexa semelhantes ($p < 0,05$) ao grupo SHAM KOH (n=7) e superiores ($p < 0,05$) ao grupo 2R1C KOH (n= 8) (Figura 5, painel B, Tabela 3).

A avaliação do componente taquicárdico do controle reflexo da FC do ratos SHAM tratados com AVE 0991 1 e 3 mg/kg foram similares ($p > 0,05$) a taquicardia reflexa dos ratos do grupo SHAM KOH (Figura 5, Painéis A e B, Tabela 3).

Taquicardia Reflexa

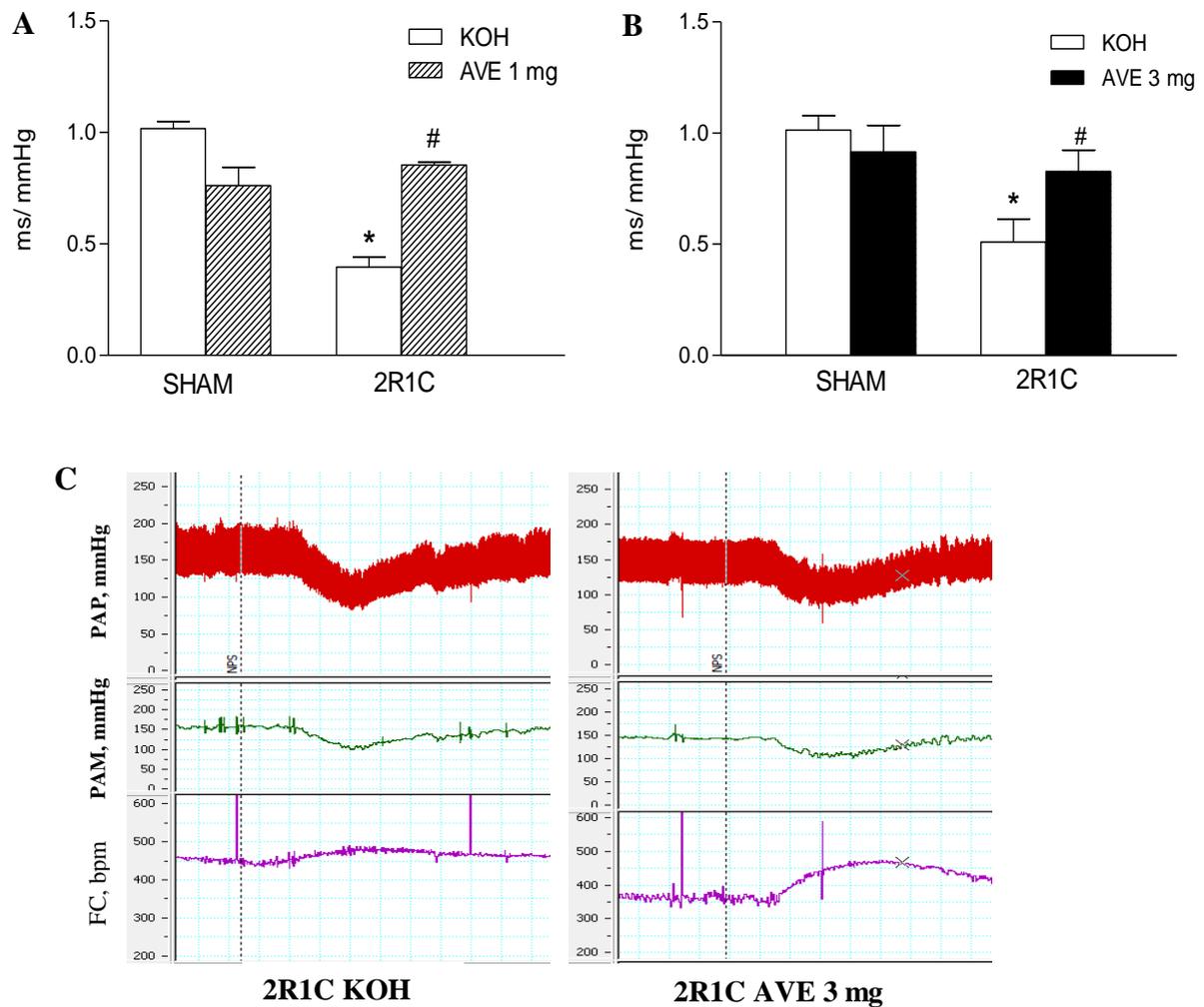


Figura 5: Alterações reflexas na FC (expressas em intervalo de pulso, IP, ms) em resposta a variação na pressão arterial média (PAM, mmHg) produzidas por doses crescentes de nitroprussiato de sódio (0,25 a 5 µg, iv) em ratos SHAM (n=5-7) ou 2R1C (n=7-9) tratados com o veículo KOH ou com AVE 0991 na concentração de 1 mg/kg ou 3 mg/kg. Painéis **A** e **B** mostram o índice da sensibilidade barorreflexa (ms/ mmHg) obtido através do *slope* da regressão linear. Painel **C** mostra a pressão arterial pulsátil (PAP, mmHg), pressão arterial média (PAM, mmHg) e frequência cardíaca (FC, bpm) ilustrando o efeito típico de injeção de nitroprussiato de sódio em um rato 2R1C KOH e um rato 2R1C AVE 3 mg. As linhas tracejadas representam o momento das injeções de nitroprussiato de sódio (1µg iv, in bolus). *p< 0,05 em comparação ao grupo SHAM. #p< 0,05 em comparação a 2R1C KOH (ANOVA seguido por Newman-Keuls).

Tabela 03: Sensibilidade da taquicardia reflexa, expressa pela relação $\Delta IP/ \Delta PAM$ (ms/ mmHg) em animais normotensos SHAM ou hipertensos 2R1C tratados com KOH (controle) ou tratados com AVE 0991 na concentração de 1 mg/kg ou 3 mg/kg

		Taquicardia Reflexa (ms/mmHg)
SHAM (n= 5-7)	KOH	1,02 ± 0,032
	AVE 1 mg	0,8 ± 0,08
SHAM (n=7)	KOH	0,95 ± 0,16
	AVE 3 mg	0,98 ± 0,11
2R1C (n=7)	KOH	0,39 ± 0,045*
	AVE 1 mg	0,8 ± 0,01
2R1C (n= 8-9)	KOH	0,47 ± 0,011*
	AVE 3 mg	0,96 ± 0,07#

Valores expressos em média ± erro padrão da média. *p<0,05 em comparação aos animais SHAM KOH. # p< 0,05 em comparação a 2R1C KOH (ANOVA seguido por Newman-Keuls).

5.2.4 Avaliação do Peso Úmido do Coração

A figura 6 e tabela 4 mostram que o peso úmido relativo do coração (peso do coração em relação ao peso corporal) dos animais 2R1C KOH (n=8) e 2R1C AVE 1 mg (n=9) foram similares entre si e superiores ($p < 0,05$) aos valores encontrados nos respectivos animais SHAM.

Entretanto, os valores de peso úmido relativo do coração dos animais 2R1C AVE 3 mg (n=9) foram similares ($p > 0,05$) aos dos animais SHAM AVE 3 mg (n=3) e menores ($p < 0,05$) do que os valores encontrados nos animais 2R1C KOH (Figura 6 e Tabela 4).

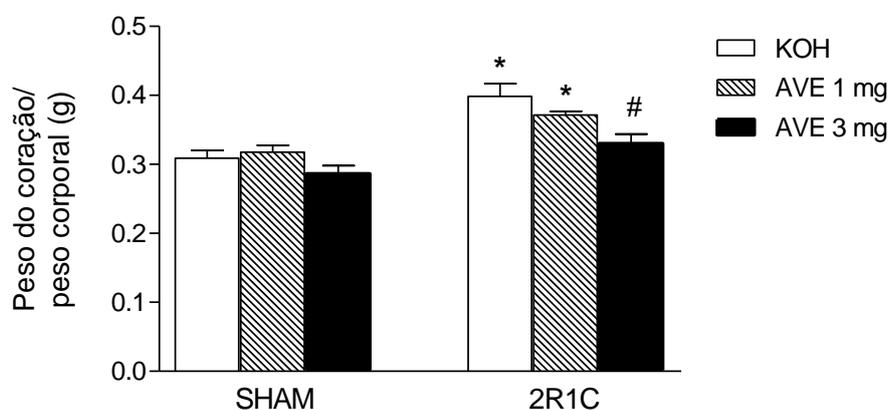


Figura 6: Alteração no peso úmido relativo do coração em relação ao peso corporal (g/100g) em ratos SHAM (n=6-9) e 2R1C (n=8-10) submetidos ao tratamento intragástrico, por 28 dias, com KOH ou AVE 0991 na dose 1 ou 3 mg/kg. * $p < 0,05$ em comparação aos animais SHAM KOH. # $p < 0,05$ em comparação a 2R1C KOH (ANOVA seguido por Newman-Keuls).

Tabela 04: Valores da relação peso úmido do coração/ peso corporal (g/100g) dos animais normotensos SHAM ou hipertensos 2R1C tratados com KOH (controle) ou tratados com AVE 0991, na concentração de 1 mg/kg ou 3 mg/kg

		Peso do coração/ Peso corporal (g/100g)
SHAM (n= 6-9)	KOH	0,31 ± 0,01
	AVE 1 mg	0,32 ± 0,01
	AVE 3 mg	0,29 ± 0,01
2R1C (n=8-10)	KOH	0,40 ± 0,018*
	AVE 1 mg	0,37 ± 0,01*
	AVE 3 mg	0,33 ± 0,01#

Valores expressos em média ± erro padrão da média. * p<0,05 em comparação aos animais SHAM KOH. #p< 0.05 em comparação a 2R1C KOH (ANOVA seguido por Newman-Keuls).

5.2.5 Avaliações histológicas do coração

Em cortes histológicos de VE corados por HE, foram realizadas avaliações quantitativas para determinar a espessura das fibras miocárdicas e o número de células inflamatórias. Para a detecção de colágeno intersticial e perivascular foram realizadas análises em cortes histológicos corados por Tricômico de Masson.

Os valores de espessura das fibras miocárdicas do VE dos grupos 2R1C KOH (n=3), 2R1C AVE 1 mg (n=3) e 2R1C AVE 3 mg (n=3) foram superiores ($p<0,05$) aos valores encontrados no VE dos respectivos grupos SHAM (n=3). Porém, os valores encontrados de espessura das fibras miocárdicas do VE nos grupos 2R1C AVE 1 mg ou 3 mg foram inferiores ($p<0,05$) a espessura das fibras do VE dos animais 2R1C KOH (Figuras 7, Painel A; Figura 8, tabela 5).

A figura 7 mostra o resultado da contagem total de células observadas nos grupos SHAM ou 2R1C tratados com KOH ou AVE 0991 nas doses de 1 mg/kg ou 3 mg/kg. Os animais 2R1C KOH apresentaram maior número de células inflamatórias do que os encontrados em todos os demais grupos de ratos SHAM (KOH, AVE 1 mg e AVE 3 mg) e 2R1C (AVE 1 mg e AVE 3 mg) (Figura 7, painel B, Tabela 5).

Em relação à fibrose avaliada através da detecção de colágeno, assim como a quantificação de células inflamatórias, o grupo 2R1C KOH apresentou valores superiores ($p<0,05$) aos encontrados nos demais grupos SHAM ou 2R1C, tratados com KOH ou AVE 0991 (nas doses de 1 mg/kg ou 3 mg/kg) (Figura 7, painel C; Figura 9 e Tabela 5).

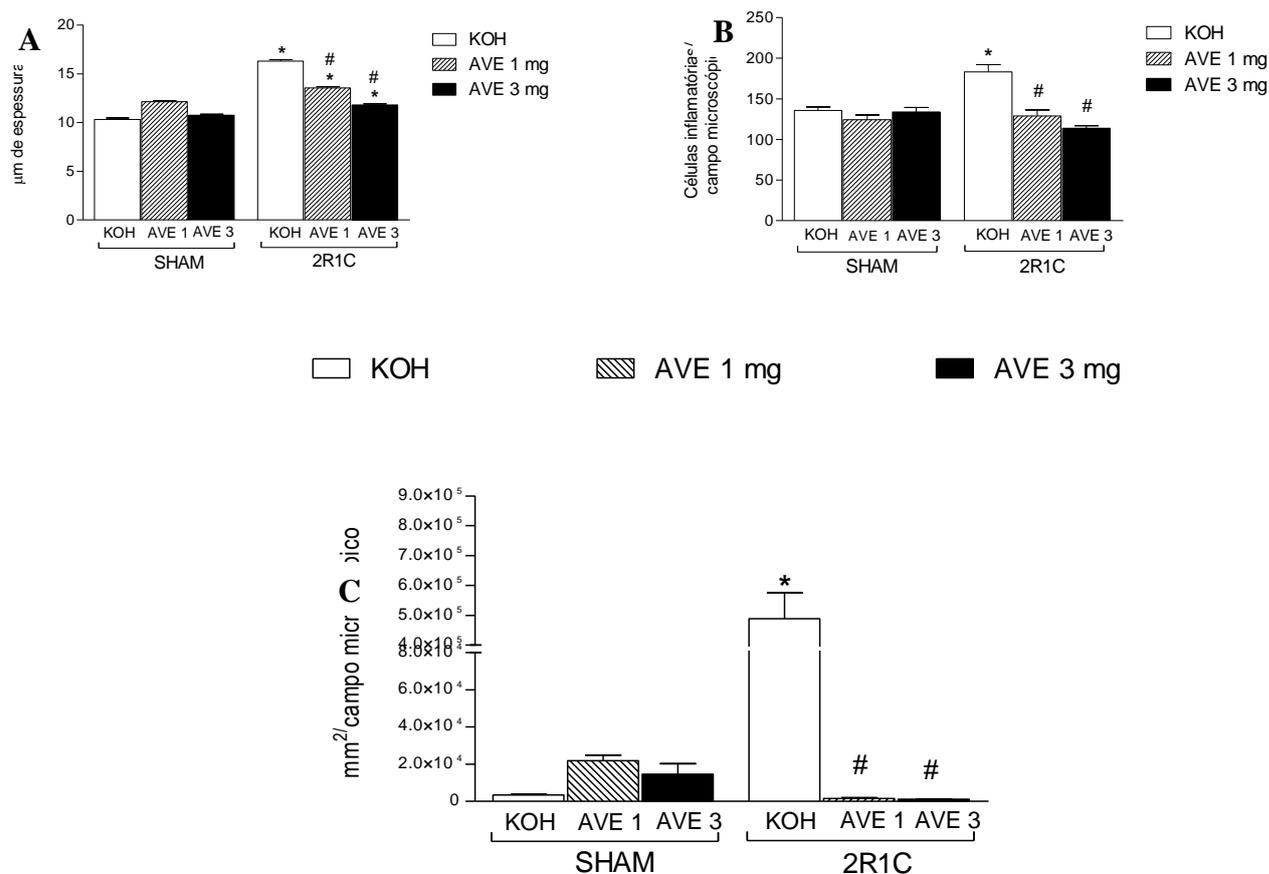


Figura 7: Alterações histológicas do VE de ratos SHAM (n=3-4) ou 2R1C (n=3-4) submetidos a tratamento intragástrico, por 28 dias, com AVE 0991 na dose 1 ou 3 mg/kg ou com o veículo KOH. Paineil **A**: espessura das fibras miocárdicas do ventrículo esquerdo (µm). Paineil **B**: contagem do número de células inflamatórias (n^o) presentes no miocárdio. Paineil **C**: área correspondente a deposição de colágeno (mm²/campo microscópico). *p < 0,05 em comparação ao grupo SHAM. #p < 0,05 em comparação ao grupo 2R1C KOH (ANOVA seguido por Newman-Keuls).

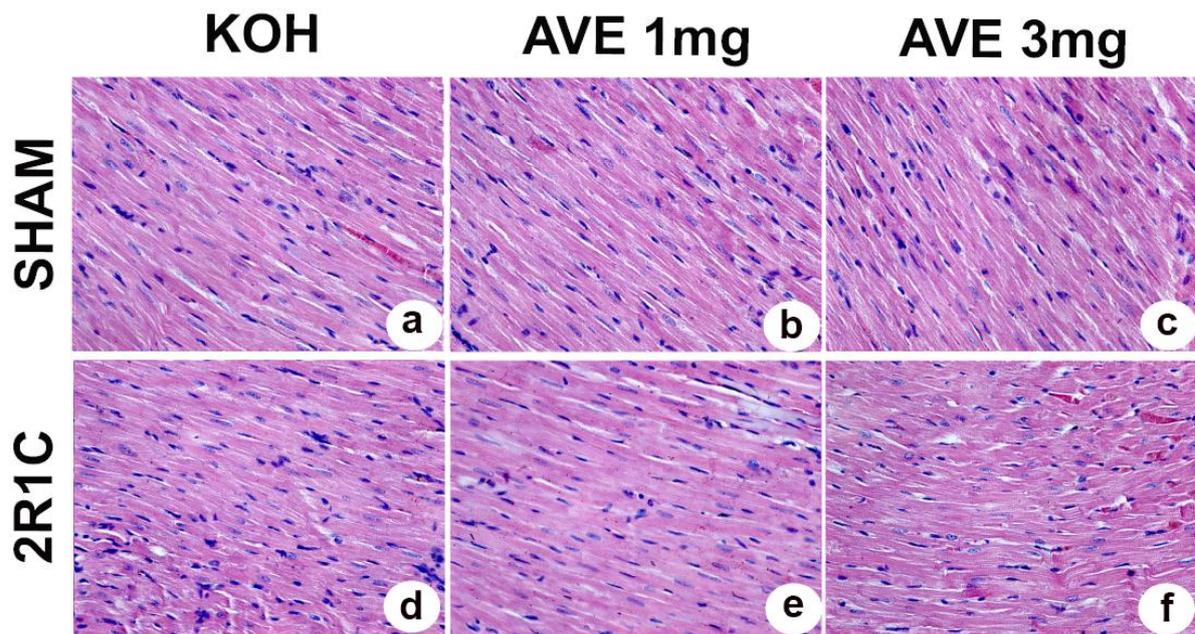


Figura 8: Fotomicrografias de fibras miocárdicas do VE de ratos SHAM ou 2R1C tratados com KOH ou AVE 0991 nas doses 1 ou 3 mg/kg. Observa-se diâmetro das fibras cardíacas compatíveis com a normalidade em painéis A, B e C (SHAM KOH, SHAM AVE 1mg e SHAM AVE 3 mg, respectivamente). Aumento do diâmetro das fibras pode ser visto nos painéis D (2R1C KOH) e E (2R1C AVE 1 mg) e em menor intensidade no painél F (2R1C AVE 3 mg). Hematoxilina eosina, 440X.

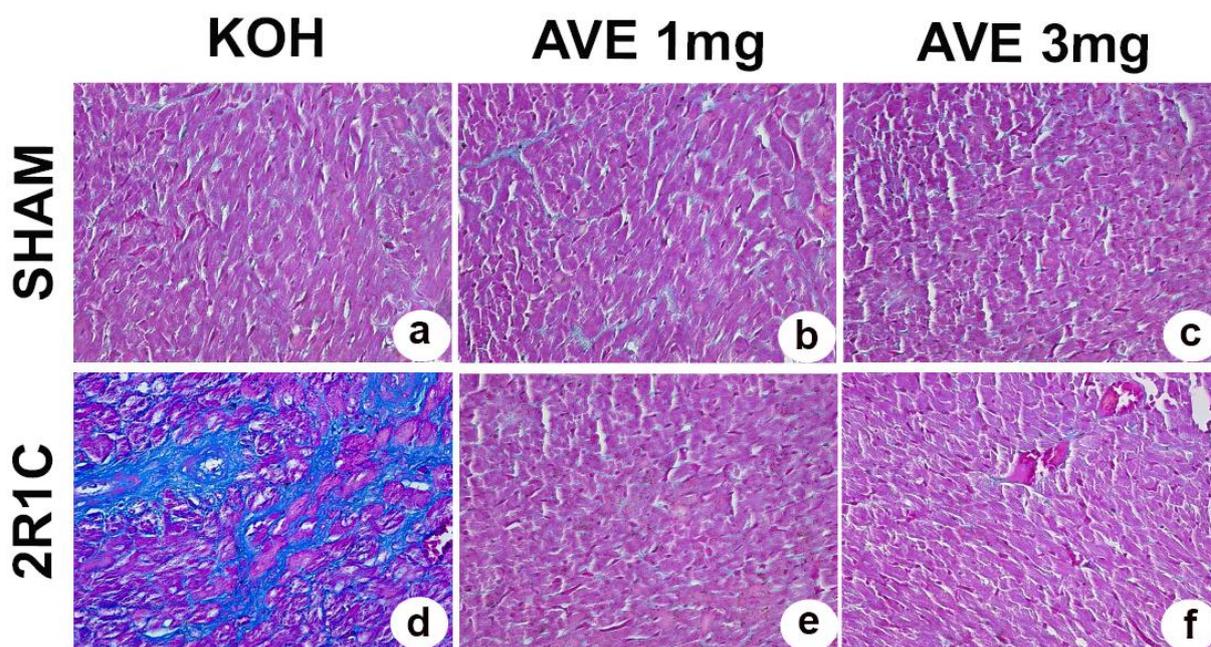


Figura 9: Fotomicrografias do VE de ratos SHAM ou 2R1C tratados com KOH ou AVE 0991 nas doses 1 ou 3 mg/kg evidenciando a deposição de colágeno. Observa-se um aumento da deposição de colágeno (presença de fibrose) somente no grupo 2R1C KOH (painél D). Nos demais grupos: painéis A, B, C, E e F (SHAM KOH, SHAM AVE 1mg e SHAM AVE 3 mg, 2R1C AVE 1 mg, e 2R1C AVE 3mg, respectivamente). a área correspondente ao colágeno é compatível com a normalidade. Tricômico de Masson, 440X.

Tabela 05: Avaliações histológicas e morfométricas do VE dos animais normotensos SHAM ou hipertensos 2R1C tratados com KOH ou AVE 0991 nas doses de 1 mg/kg ou 3 mg/kg

		Espessura das fibras dos miócitos	n° de células	Fibrose
SHAM (n= 3-4)	KOH	10,31 ± 0,16	135,5 ± 4,5	3462 ± 315
	AVE 1 mg	12,13 ± 0,10	124,3 ± 5,7	21906 ± 2947
	AVE 3 mg	10,75 ± 0,10	133,7 ± 5,5	14703 ± 5531
2R1C (n=3-4)	KOH	16,29 ± 0,13*	183,0 ± 9*	487947 ± 87018*
	AVE 1 mg	13,56 ± 0,12 *#	129,0 ± 7,3	1631 ± 351
	AVE 3 mg	11,79 ± 0,11*#	113,9 ± 3*	1082 ± 164

Valores expressos em média ± erro padrão da média. * p<0,05 em comparação aos animais SHAM KOH. #p<0,05 em comparação ao grupo 2R1C KOH (ANOVA seguido por Newman-Keuls).

5.2.6 Avaliação do Peso Úmido dos Rins

Com o objetivo de avaliar se a estenose provocada pela inserção do clipe na artéria renal (rim esquerdo) poderia ser um parâmetro para confirmar a hipertensão renovascular, foi avaliado o peso úmido relativo dos rins em relação ao peso corporal dos animais normotensos SHAM ou hipertensos 2R1C, tratados com KOH (controle) ou tratados com AVE 0991, na dose de 1 mg/kg ou 3 mg/kg.

Na Figura 10 (painel A) e Tabela 6 estão representados os valores do peso úmido relativo dos rins. Em todos os grupos 2R1C (KOH, AVE 1 mg e AVE 3 mg, n=7-13) o peso úmido relativo do rim esquerdo (clipado) foi menor ($p < 0,05$) do que o peso úmido do rim direito (não clipado). Em relação aos grupos SHAM (KOH, AVE 1 mg e AVE 3 mg, n=5-14), não houve diferenças ($p > 0,05$) entre os valores encontrados do peso úmido relativo entre os rins direito e esquerdo.

Foi avaliado também, o percentual de redução do rim esquerdo (clipado) em relação ao rim direito (não clipado) (Figura 10, painel B, Tabela 6). Os valores do percentual de redução do rim esquerdo em relação ao rim direito dos ratos 2R1C (KOH, AVE 1 mg e AVE 3 mg) são maiores ($p < 0,05$) em relação aos valores percentuais encontrados nos grupos de ratos SHAM (KOH, AVE 1 mg e AVE 3 mg).

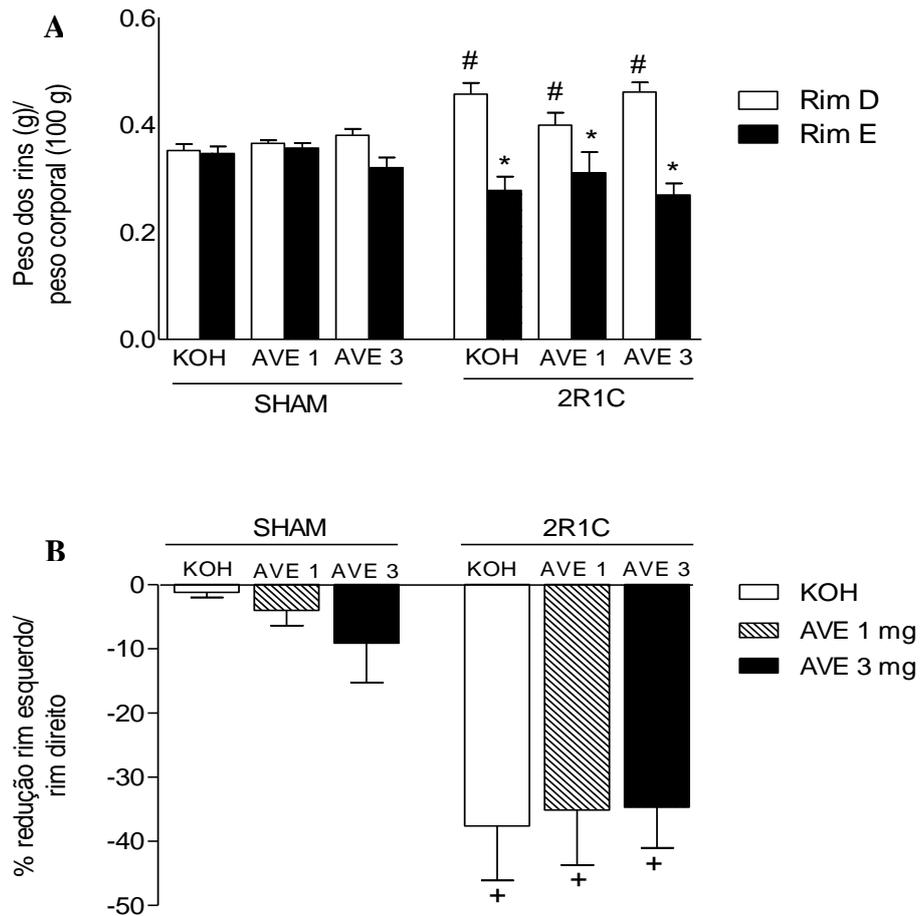


Figura 10: Alterações no peso úmido relativo dos rins. Painel **A**: alterações no peso úmido dos rins esquerdo/peso corporal (g/ 100g de peso de rato) e rins direito/ peso corporal (g/ 100g de peso de rato) em ratos SHAM (n=5-14) e 2R1C (n=7-13) submetidos ao tratamento intragástrico, por 28 dias com KOH ou AVE 0991 na concentração de 1 mg/kg ou 3 mg/kg. Painel **B**: avaliação do percentual (%) de redução do peso úmido do rim clipado (g) (rim esquerdo/rim direito X 100 – 100). *p<0,05 em relação ao rim esquerdo dos respectivos animais SHAM. #p<0,05 em relação ao rim esquerdo dos respectivos animais SHAM. +p<0,05 em relação aos animais SHAM KOH (ANOVA seguido por Newman-Keuls).

Tabela 06 : Valores de peso úmido relativo do rim direito e esquerdo e porcentagem de redução do rim esquerdo

	SHAM			2R1C		
	KOH	AVE 1 mg	AVE 3mg	KOH	AVE 1mg	AVE 3mg
Rim Direito	0,35±0,01	0,36±0,01	0,38±0,01	0,45±0,02#	0,39±0,02#	0,46±0,02#
Rim Esquerdo	0,34±0,01	0,35±0,01	0,32±0,02	0,27±0,02*	0,31±0,03*	0,26±0,02*
% Redução	-1,17±0,8	-3,9±2,3	-9±6,1	-37,9±8,4+	-35,1±8,5+	-34,7±6,3+
N	14	9	5	13	8	7

Valores expressos em média ± erro padrão da média. #p<0,05 em relação ao rim direito dos animais SHAM. *p<0,05 em relação ao rim esquerdo dos animais SHAM. †p<0,05 em relação aos respectivos animais SHAM (ANOVA seguido por Newman-Keuls).

5.2.7 Avaliações histológicas no rim direito

A Figura 11, painel A, mostra a contagem do número de células inflamatórias nas regiões corticais e medulares do rim direito. Os animais 2R1C KOH e 2R1C AVE 3 apresentaram maior número de células inflamatórias ($p < 0,05$) em relação aos valores encontrados nos demais grupos de SHAM (KOH, AVE 1 mg e AVE 3 mg) e 2R1C (AVE 1 mg) (Figura 11, painel A e Tabela 7).

Não foram observadas diferenças ($p > 0,05$) no rim direito dos ratos SHAM ou 2R1C tratados com KOH ou AVE 0991 na concentração de 1 mg/kg ou 3 mg/kg em relação a área de depósito de colágeno (Figura 11, painel B e Tabela 7).

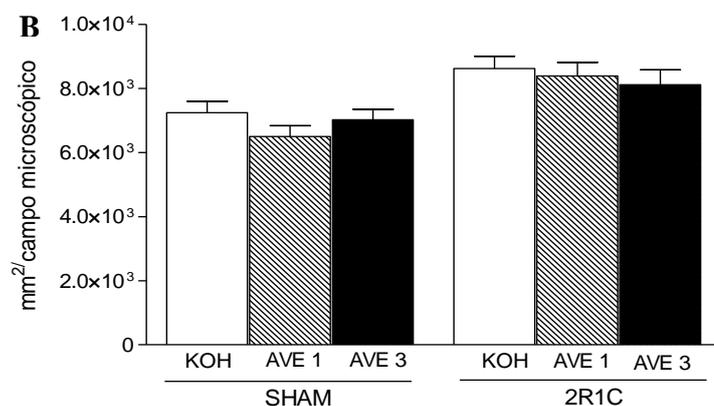
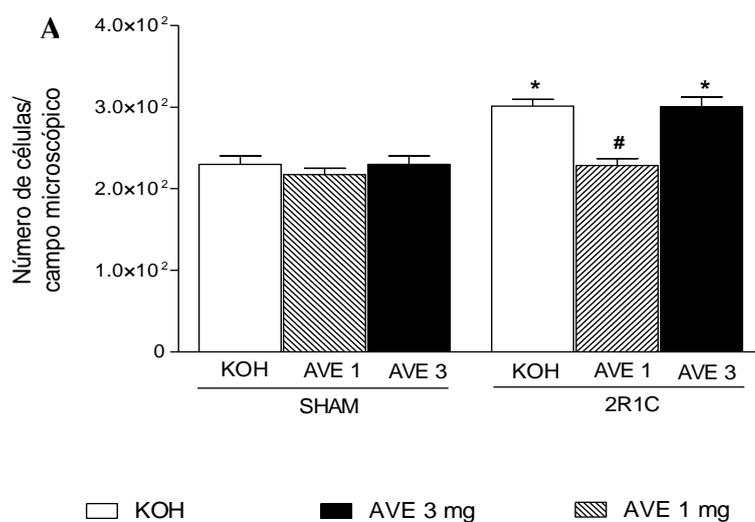


Figura 11: Alterações histológicas do rim direito (regiões cortical e medular) de ratos SHAM (n=3-4) ou 2R1C (n=3-4) submetidos ao tratamento intragástrico, por 28 dias, com AVE 0991 nas doses 1 ou 3 mg/kg ou com o veículo KOH. Painel **A**: observa-se a contagem de células inflamatórias (nº) presentes rim direito. Painel **B**: observa-se a área correspondente ao depósito de colágeno (mm²/campo microscópico). *p< 0,05 em comparação ao grupo SHAM. #p<0,05 em comparação ao grupo 2R1C KOH (ANOVA seguido por Newman-Keuls).

Tabela 7: Avaliações histológicas e morfométricas do rim direito dos animais normotensos SHAM ou hipertensos 2R1C tratados com KOH ou AVE 0991 na dose de 1 mg/kg ou 3 mg/kg

		nº de células	Fibrose
SHAM (n= 3-4)	KOH	229,8 ± 10,17	7245 ± 358
	AVE 1 mg	217,3 ± 7,8	6501 ± 338
	AVE 3 mg	229,8 ± 10,2	8386 ± 428
2R1C (n=3-4)	KOH	301,3 ± 8 *	8625 ± 383
	AVE 1 mg	228,4 ± 8,4#	7026 ± 328
	AVE 3 mg	300,6 ± 11,9 *	8120 ± 461

Valores expressos em média ± erro padrão da média. *p<0,05 em comparação aos animais SHAM KOH. #p<0,05 em comparação aos animais 2R1C KOH (ANOVA seguido por Newman-Keuls).

5.2.8 Avaliações histológicas no rim esquerdo

A figura 12 (painel A), mostra a média do total do número de células nas regiões corticais e medulares do rim esquerdo. Os animais 2R1C KOH e 2R1C AVE 1 e 3 mg/kg (n=3-4) apresentaram maior número de células inflamatórias ($p<0,05$) em relação aos valores encontrados nos demais grupos de SHAM (KOH, AVE 1 mg e AVE 3 mg, n=3-4). Entretanto, os animais 2R1C AVE 1 mg apresentaram valores menores do número de células inflamatórias ($p<0,05$) em relação aos valores encontrados nos grupos 2R1C KOH (Figura 12, painel A, tabela 8).

Em relação à deposição de colágeno, o grupo 2R1C KOH e 2R1C AVE 1 mg apresentaram valores superiores em relação aos respectivos animais dos grupos SHAM (Figuras 12 e 13, painel B, tabela 8). No entanto, os ratos 2R1C AVE 1 mg e 3 mg apresentaram valores de deposição de colágeno inferiores em relação aos animais dos grupos 2R1C KOH. Além disso, os animais 2R1C AVE 3mg apresentaram deposição de colágeno similares aos encontrados no grupo SHAM KOH (Figuras 12 e 13, painel B e Tabela 8).

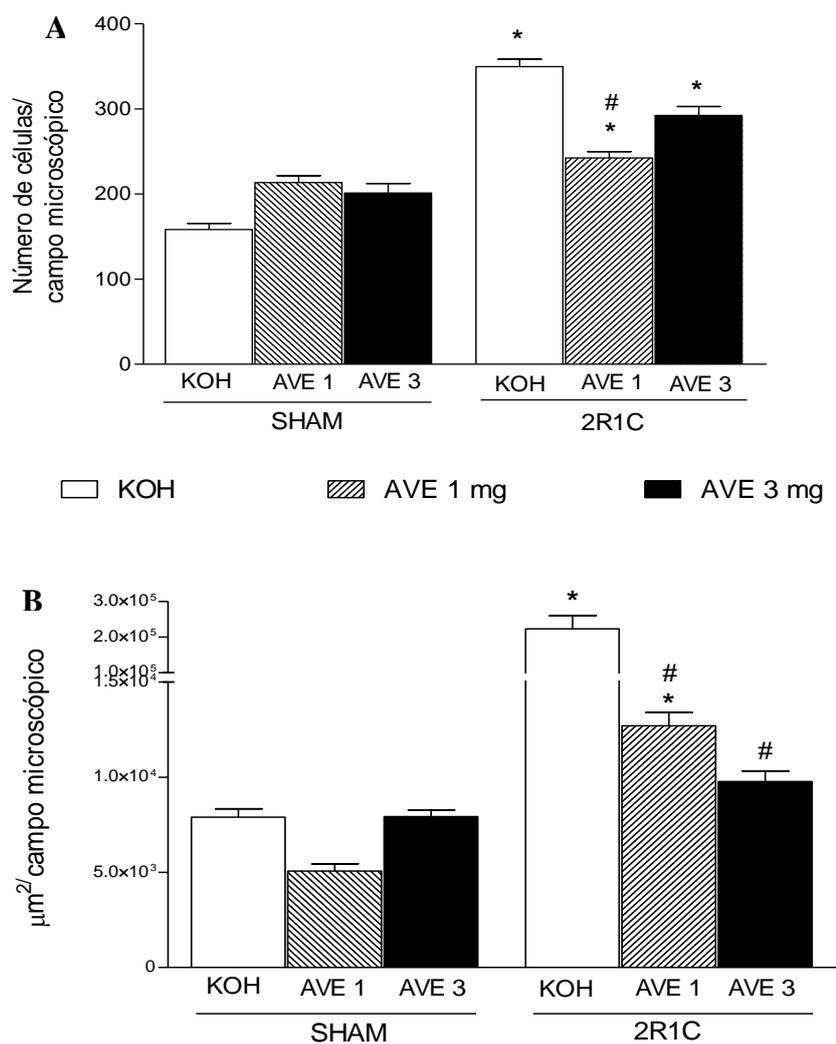


Figura 12: Alterações em cortes histológicos do rim esquerdo de ratos SHAM (n=3-4) ou 2R1C (n=3-4) submetidos a tratamento intragástrico, por 28 dias, com AVE 0991 na dose 1 ou 3 mg/kg ou do veículo KOH. Painel **A**: observa-se a contagem de células inflamatórias (n°) presentes rim esquerdo. Painel **B**: observa-se a área correspondente ao colágeno presente nos cortes (mm²/campo microscópico). *p<0,05 em comparação ao grupo SHAM. #p<0,05 em comparação com 2R1C KOH (ANOVA seguido por Newman-Keuls).

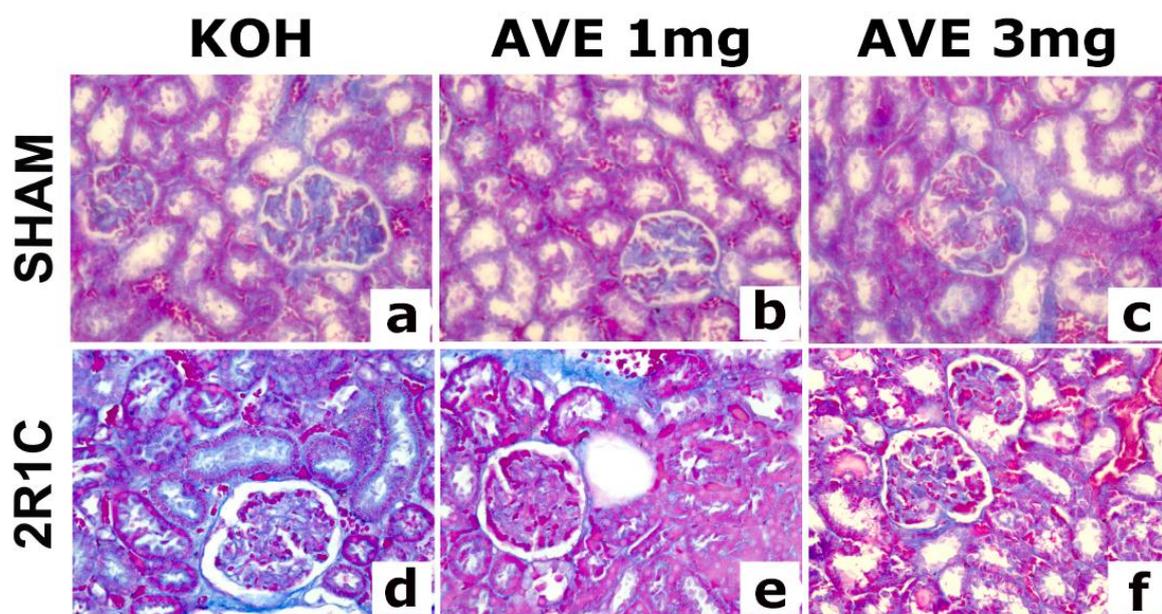


Figura 13: Fotomicrografias da região cortical do rim esquerdo de ratos SHAM ou 2R1C tratados com KOH ou AVE 0991 nas doses 1 ou 3 mg evidenciando a deposição de colágeno. Observa-se áreas com deposição de colágeno compatíveis com a normalidade em painéis **A**, **B** e **C** (SHAM KOH, SHAM AVE 1mg e SHAM AVE 3 mg, respectivamente). Aumento do área de deposição de colágeno (fibrose) pode ser visto no painel **D** (2R1C KOH) e em menor intensidade nos painéis **E** e **F** (2R1C AVE 1 mg e 2R1C AVE 3 mg, respectivamente). Tricômico de Masson, 440X.

Tabela 8: Avaliações histológicas e morfométricas do rim esquerdo dos animais normotensos SHAM ou hipertensos 2R1C tratados com KOH ou AVE 0991 na dose de 1 mg/kg ou 3 mg/kg

		nº de células	Fibrose
SHAM (n= 3-4)	KOH	158,2 ± 7,2	7895 ± 441
	AVE 1 mg	213,5 ± 7,9	5064 ± 389
	AVE 3 mg	201,2 ± 11	7931 ± 338
2R1C (n=3-4)	KOH	349,7 ± 8,7 *	222953 ± 37308 *
	AVE 1 mg	242,2 ± 7,6*#	12705 ± 701*#
	AVE 3 mg	292,1 ± 10*	9768 ± 566,6#

Valores expressos em média ± erro padrão da média. *p<0,05 em comparação aos animais SHAM KOH. #p<0,05 em comparação com 2R1C KOH (ANOVA seguido por Newman-Keuls).

5.3 Estudo de correlação

As tabelas 9 e 10 apresentam as correlações entre os diferentes parâmetros cardiovasculares e histológicos avaliados em animais com hipertensão renovascular 2R1C tratados com AVE nas doses de 1 ou 3 mg/kg.

Tabela 9: Estudo de correlação entre os valores de barorreflexo e PAM, e demais parâmetros avaliados em animais com hipertensão renovascular 2R1C ou SHAM tratados com AVE 0991 na dose 1 mg/kg ou KOH

AVE 1 mg	Barorreflexo (PHE)		PAM	
	r ²	p*	r ²	p*
Barorreflexo	.xxx	.xxx	- 0,9527	0,024
PAM	- 0,9527	0,024	.xxx	.xxx
Peso do coração	- 0,9899	0,0051	0,9179	0,0419
Diâmetro dos cardiomiocitos	- 0,8961	0,0534	0,7340	0,1432
Inflamação no coração	- 0,4453	0,3327	0,2689	0,4815
Fibrose no coração	- 0,4908	0,2994	0,2889	0,4625
Inflamação no rim esquerdo	- 0,5282	0,2732	0,3432	0,4141
Fibrose no rim esquerdo	- 0,8057	0,1024	0,8390	0,0840

* p<0,05 foram considerados estatisticamente significativos pelo teste do Coeficiente de Correlação de Pearson.

Tabela 10: Estudo de correlação entre os valores de barorreflexo e PAM, e demais parâmetros avaliados em animais 2R1C ou SHAM tratados com AVE 0991 na dose 3 mg/kg ou KOH

AVE 3 mg	Barorreflexo (PHE)		PAM	
	r ²	p*	r ²	p*
Barorreflexo	xxx	xxx	- 0,9527	
PAM	- 0,8804	0,0617	xxx	xxx
Peso do coração	- 0,8591	0,0731	0,8627	0,074
Diâmetro dos cardiomiocitos	- 0,9856	0,0072	0,7182	0,0331
Inflamação no coração	- 0,6528	0,1921	0,1740	0,4106
Fibrose no coração	-0,9028	0,0499	0,2808	0,2795
Inflamação no rim esquerdo	- 0,5774	0,2402	0,2937	0,2667
Fibrose no rim esquerdo	- 0,7621	0,1270	0,8361	0,0107

* p<0,05 foram considerados estatisticamente significativos pelo teste do Coeficiente de Correlação de Pearson.

6 Discussão

Os resultados do presente estudo mostram que o AVE 0991 foi eficiente em melhorar diferentes parâmetros que estão alterados na HRV. Em geral, o tratamento com AVE 0991, por quatro semanas, melhorou a sensibilidade do controle reflexo da FC, reduziu o diâmetro dos cardiomiócitos, o número de células inflamatórias e a fibrose cardíaca em ratos com hipertensão renovascular 2R1C. Além disso, o AVE 0991 diminuiu a fibrose e o número de células inflamatórias do rim clipado. Nossos dados mostraram também que o tratamento com AVE nas doses 1 e 3mg/kg apresentou efeitos diferentes sobre os níveis basais de PA, podendo o AVE ser uma importante ferramenta em doenças com níveis aumentados ou não de PA, como a HA e a insuficiência cardíaca.

Os estudos que objetivam elucidar o desenvolvimento e manutenção da hipertensão se justificam por essa doença apresentar uma alta prevalência e baixa taxa de controle, além de ser considerado um dos mais importantes problemas de saúde pública do mundo (SBH, VI consenso, 2011). Atualmente, apesar da existência de diversas classes de anti-hipertensivos atualmente, é de grande importância a busca por novos fármacos que possibilitem não só a redução dos níveis da PA, mas também dos eventos cardiovasculares fatais e não fatais relacionados à HA.

O SRA é considerado como o maior regulador da função renal e cardiovascular, possuindo um importante papel no controle da PA e na homeostasia dos fluidos e eletrólitos corporais (Reid e cols., 1978; Appenrodt e Bratstrom, 1994). A Ang II é formada a partir da Ang I processada pela ECA, sendo considerada um importante peptídeo do SRA. Esse octapeptídeo age através de dois subtipos de receptores AT1 e AT2, e suas principais ações são vasoconstritoras, proliferativas e pró-fibróticas. A Ang-(1-7) é considerado como um potente hormônio endógeno do SRA (Donoghe, Hsieh, Baronas, 2000 e Tipnis e cols., 2000) que tem como principal via de formação a hidrólise da Ang II pela ECA 2 (Zisman, Meixell e Bristow, 2003). A descoberta da ECA2 no ano de 2000 e a identificação do receptor Mas como seu receptor, contribuíram para estabelecer a Ang-(1-7) como um produto biologicamente ativo do SRA. Esse heptapeptídeo age através da ativação da proteína G acoplada a um receptor Mas e suas ações frequentemente se opõem àquelas ações atribuídas à Ang II, levando à

vasodilatação (Ferrario e cols., 2005) e ações antiproliferativas (Tallant e cols., 2005). A Ang-(1-7) junto ao seu receptor Mas e a enzima ECA 2 formam o eixo ECA 2-Ang-(1-7)-Mas exercendo, frequentemente, um papel contrarregulador em relação ao clássico eixo ECA-Ang II-AT1 (Santos e Ferreira, 2006), sugerindo uma nova visão acerca do SRA e um potencial uso terapêutico da Ang-(1-7) em diversas condições patológicas, principalmente na hipertrofia cardíaca e na hipertensão arterial.

Alguns estudos apontam para um possível papel da Ang-(1-7) no controle dos níveis de PA (Iyer e cols., 1998; Simões e Silva e cols., 2004; Burgelová e cols., 2005 e 2009). Burgelová e colaboradores (2005) demonstraram que o bloqueio crônico dos receptores da Ang-(1-7) pela infusão do seu antagonista A-779, agravaram o desenvolvimento e a manutenção dos níveis elevados da PA na hipertensão renovascular 2R1C, reforçando a ideia de que a Ang-(1-7) atua atenuando, pelo menos em parte, as ações vasoconstritoras decorrentes da elevação dos níveis de Ang II. Adicionalmente, estudos da literatura avaliaram os efeitos da infusão de Ang-(1-7) sobre a PAM em ratos hipertensos. Burgelová e colaboradores. (2009) mostraram que a infusão crônica da Ang-(1-7) (na dose 50 µg/h e frequência de 6µl/h) sob a via subcutânea através de minibombas osmóticas em ratos com hipertensão 2R1C não reduziu os níveis da PA, porém, nesse mesmo estudo, os autores observaram que a infusão crônica de A-779 e o tratamento crônico com inibidor da ECA2 (3,5-dichloro) pioraram os níveis de hipertensão, sugerindo então, que a ausência da Ang-(1-7) pode contribuir para a aceleração da hipertensão renovascular. Já estudos de Pei e colaboradores (2010), mostraram que a administração subcutânea também por minibombas osmóticas de Ang-(1-7) (24 µg/kg/h e frequência de 5µl/h) reduziu, mas não aboliu a hipertensão em animais SHR, sendo que esse efeito foi abolido pela administração do A-779. Esses estudos, em conjunto, estão de acordo com o nosso presente estudo em que o análogo não peptídico da Ang-(1-7), AVE 0991 na dose 3 mg/kg, reduziu significativamente os níveis de PA em ratos com hipertensão renovascular 2R1C.

Wiemer e colaboradores (2002) publicaram o primeiro estudo descrevendo o AVE 0991 como um composto biologicamente ativo e resistente às enzimas proteolíticas gástricas possibilitando uma possível forma de explorar o papel da Ang-(1-7) no tratamento de doenças cardiovasculares. Esses autores mostraram, *in vitro*, que o tratamento com AVE estimulou a liberação de óxido nítrico e reduziu a liberação de

superóxido no endotélio, de maneira semelhante aos efeitos da Ang-(1-7) no endotélio, reforçando o papel do AVE 0991 como análogo da Ang-(1-7). Esse perfil de liberação de óxido nítrico apresentado pelo AVE, sugere um possível papel terapêutico desse composto no tratamento da disfunção endotelial.

Posteriormente, estudos de Pinheiro e colaboradores (2004) em camundongos com deleção genética para receptor Mas (Mas-KO) confirmaram que o AVE é um agonista do receptor Mas; nesse mesmo estudo, esses autores mostraram que o AVE (0,58 nMol/g) não alterou os níveis basais de PA dos animais. Em adição, Faria-Silva e colaboradores (2005) observaram que o estímulo agudo do receptor Mas pela Ang-(1-7) (7 pmol/min) e AVE 0991 (45 pmol/min) administrados por infusão intravenosa melhorou a função endotelial através da liberação do óxido nítrico em ratos Wistar, e além disso, não foram observadas alterações na PAM após administração da Ang-(1-7) ou do AVE. Apesar de esses estudos terem avaliado os efeitos do AVE sobre a PA agudamente e o nosso cronicamente, esses resultados coincidem com os nossos presentes dados em que o tratamento com AVE na dose 1 mg/kg não alterou os níveis de PA em ratos normotensos e hipertensos 2R1C.

Ferreira e colaboradores (2007) avaliaram os efeitos do tratamento com AVE (1 mg/kg) por sete dias, na insuficiência cardíaca induzida pelo isoproterenol e não observaram mudanças na PA ao final do tratamento com AVE 0991. De maneira semelhante, Zeng e colaboradores (2010) avaliaram os efeitos do tratamento crônico, por quatro semanas, com AVE 0991 (1 mg/kg) em ratos SD submetidos a cirurgia de ligação coronária para induzir o infarto do miocárdio e não observaram alterações na PA e FC dos animais tratados com AVE 0991. Ambos os estudos, citados acima, foram realizados em modelos experimentais de insuficiência cardíaca que apresentavam níveis normais de PA, no entanto, esses estudos estão de acordo como nossos resultados em que o tratamento com AVE na dose 1 e 3 mg/kg não alterou os níveis basais de PAM em ratos SHAM normotensos e com o tratamento com o AVE na dose 1 mg/kg em ratos com HRV 2R1C.

Entretanto, Benter e colaboradores (2006), utilizando animais SHR com 17 semanas de idade tratados com L-Name (um inibidor da óxido nítrico sintase), obtiveram como resultado que a Ang-(1-7) e AVE 0991 (24 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$, administrado na água) preveniu, mas não aboliu a hipertensão, além de induzir redução da lesão renal, restauração da reatividade do leito vascular e proteção do coração em resposta à

isquemia. De maneira semelhante aos nossos resultados do presente estudo, o tratamento com AVE 0991 na dose 3 mg/kg levou a uma redução dos níveis basais de PA em ratos com hipertensão renovascular 2R1C. Essa redução dos níveis de PA pode ser considerada fisiologicamente relevante uma vez que diminui a pós-carga cardíaca e essa redução possui relação direta com o desenvolvimento da hipertrofia cardíaca e, além disso, reduz alterações endoteliais, renais, dentre outros efeitos secundários aos elevados níveis de PA que ocorrem na hipertensão arterial (Savage, Drayer e Henry, 1979 e Hammond e cols., 1988).

A regulação efetiva da PA ocorre como resultado de sistemas de retroalimentação em curto e em longo prazo. O principal mecanismo de controle em curto prazo é desempenhado por reflexos originados nos pressoreceptores arteriais e nos receptores de estiramento da região cardiopulmonar (Campagnole-Santos e Haibara, 2001). O estudo do barorreflexo é de grande importância clínica, visto que a redução da sensibilidade barorreflexa é considerada um fator de risco para hipertrofia do ventrículo esquerdo, insuficiência cardíaca (Piratello e Cols, 2010) infarto agudo do miocárdio, e da morte súbita que se segue ao infarto agudo do miocárdio (Fei e cols., 1994).

Já está bem estabelecido na literatura que tanto animais quanto pacientes com hipertensão arterial apresentam atenuação importante da sensibilidade barorreflexa (McCubbin, Green e Page, 1966; Eckberg, 1979; Korner e cols., 1974; Rodrigues e cols., 2007; Cangussu e cols., 2009), além disso, o grau de atenuação do barorreflexo tem forte correlação com a severidade da hipertensão (Campagnole-Santos e Haibara, 2001). Em nosso presente estudo os níveis pressóricos dos animais correlacionaram-se inversamente em relação à redução da sensibilidade do controle reflexo da FC (AVE 1 mg, $r=-0,9527$; AVE 3 mg, $r=-0,8804$).

Nossos dados mostraram que os animais com hipertensão renovascular 2R1C KOH apresentaram uma piora na sensibilidade da bradicardia e taquicardia reflexa em relação aos ratos controle SHAM KOH. Esses resultados corroboram com dados anteriores de nosso laboratório (Rodrigues e cols., 2007; Cangussu e cols., 2009, Soares e cols., 2011) e com estudos prévios encontrados na literatura (Moreira e cols., 1998; Matsumura e cols., 1989; Kumagai e cols., 1990).

ANG II e a Ang-(1-7) atuam como moduladores contra regulatórios no controle barorreflexo em ratos normotensos (Campagnole-Santos e cols., 1992, Ferrario e cols., 1997 e Polson e cols., 2007) e hipertensos (Britto, 1997, Chaves, 2000 e Heringer-

Walter, 2001). Enquanto a Ang II reduz a sensibilidade barorreflexa (Castro e Phillips, 1986; Head, 1996), a Ang-(1-7) induz a facilitação do barorreflexo, tanto periféricamente (Santos e Campagnole, 2000) quanto administrada intracerebroventricular (ICV) (Campagnole e cols., 1992; Oliveira e cols., 1996; Britto e cols., 1997, e Santos e Campagnole-Santos, 2000).

No presente estudo, o tratamento com AVE nas doses de 1 e 3mg/kg melhoraram a sensibilidade da taquicardia reflexa nos ratos com hipertensão renovascular. Entretanto, em relação à bradicardia reflexa, somente no grupo 2R1C tratado com AVE na dose de 3mg/kg houve melhora da sensibilidade da bradicardia reflexa em relação ao grupo 2R1C tratado com KOH.

Um aspecto metodológico que deve ser considerado na interpretação dos nossos resultados, relaciona-se ao uso do nitroprussiato de sódio, um doador de óxido nítrico para avaliar a sensibilidade da taquicardia barorreflexa. De acordo com Musialek e Casadei (2000), como doadores de óxido nítrico, os nitrovasodilatadores possuem algumas ações extra-vasculares que podem interferir na avaliação do controle reflexo da PA. O principal fato que deve ser levado em consideração, é que a queda na PA observada pode não ser diretamente devido a alterações na transmissão barorreflexa ou da atividade do sistema nervoso autônomo (Musialek e Casadei, 2000). A literatura é controversa, mas uma possível interferência se relaciona a um efeito cronotrópico positivo independente de alterações na PA, causado por uma ativação decorrente da hiperpolarização da corrente I_f (corrente de entrada de íons para dentro da célula, induzida por hiperpolarização, que contribui para da despolarização diastólica lenta) (Hogan e cols., 1999; Casadei e Paterson, 1999; Musialek e Casadei, 2000). Como já mencionado anteriormente, o AVE também libera óxido nítrico (Wiemer e cols., 2002) possibilitando uma provável interação com o nitroprussiato de sódio e induzindo assim, uma potencialização dos efeitos deste, podendo explicar a melhora da sensibilidade do controle reflexo da FC no componente taquicárdico e não no bradicárdico, após a administração do AVE 0991 na dose 1mg/kg.

Além disso, segundo Campagnole-Santos (1992 e 2001) a Ang-(1-7) é capaz de produzir uma facilitação no controle reflexo da FC, e esse efeito é seletivo para a bradicardia reflexa. Em nosso estudo, o AVE 0991 proporcionou uma melhora da sensibilidade da bradicardia barorreflexa somente na dose de 3 mg/kg, sugerindo que esse efeito pode ser dependente da dose administrada.

Corroborando nosso achado de melhora da sensibilidade barorreflexa pelo tratamento com AVE 0991 (3 mg/kg), Britto e colaboradores (1997) observaram que a infusão central (ICV) do antagonista seletivo da Ang-(1-7), A-779, produz uma completa reversão da melhora do controle reflexo da FC observados em ratos com hipertensão renovascular 2R1C submetidos ao tratamento crônico com enalapril (inibidor da ECA), sugerindo que a Ang-(1-7) pode desempenhar efeitos cardiovasculares benéficos através da inibição periférica da ECA. Posteriormente, Heringer-Walther e colaboradores (2001) avaliaram a participação da Ang-(1-7) endógena na melhora da sensibilidade da bradicardia reflexa em ratos SHR, após infusão ICV de um inibidor da ECA (Ramipril) e concluíram que a Ang-(1-7) está envolvida na melhora da sensibilidade da bradicardia reflexa durante inibição central da ECA.

Em adição, alguns estudos de literatura tem sugerido que o aumento da sensibilidade barorreflexa pode ser devido a um aumento da atividade vagal (Brum e cols., 2000; Minami e cols., 2003) e/ou atenuação da atividade simpática (Minami e cols., 2003; Kramer e cols., 2002).

De acordo com esses achados da literatura, uma possibilidade para explicar como o tratamento com AVE 0991 poderia melhorar a sensibilidade do controle reflexo da FC, observada nesse presente estudo, poderia ser devido a atuação do AVE 0991 em áreas centrais que participam do controle barorreflexo. Entretanto, para isso teríamos que considerar que AVE poderia atravessar a barreira hematoencefálica. No entanto, não encontramos dados na literatura evidenciando que o AVE 0991 administrado oralmente esteja presente no cérebro, nesse sentido, mais estudos são necessários para comprovar essa hipótese.

Estudo recente de nosso laboratório (Soares e cols., 2011) e de outros grupos (Ceroni e cols., 2009; Moraes-Silva e cols., 2010) tem evidenciado que o exercício físico de baixa intensidade induz uma melhora da sensibilidade do controle reflexo da FC em animais hipertensos 2R1C, que essa melhora na sensibilidade barorreflexa é fortemente correlacionada com a redução da PAM, com a hipertrofia cardíaca e normalização das alterações do aumento da relação parede/ lúmen de arteríolas do músculo esquelético e tecido renal e com a redução da fibrose renal.

Similarmente ao efeito do exercício físico citado acima, em nosso presente estudo, mostramos que o tratamento com AVE 0991 na dose 3 mg/kg em ratos 2R1C melhorou a sensibilidade do controle reflexo da FC e que existe uma forte correlação negativa com a redução do diâmetro de cardiomiócitos ($r=0,9856$), com o peso do coração ($r=-0,8591$), com a deposição de colágeno no ventrículo esquerdo ($r=0,9028$) e rim esquerdo ($r=-0,7621$) e com a PAM ($r=-0,8804$). Corroborando essa afirmativa também podemos explicar nossos achados em que o tratamento com AVE na dose 1 mg/kg não melhorou a bradicardia reflexa uma vez que apesar de ter induzido uma redução no número de células inflamatórias, no diâmetro de cardiomiócitos e da fibrose cardíaca esse tratamento não reduziu a PAM e não preveniu a fibrose no rim clipado.

O único estudo encontrado avaliando os efeitos do AVE 0991 sobre o controle central da FC foi o de Wessel e colaboradores (2007). Esses autores avaliaram por telemetria os efeitos do AVE no controle da PA (variabilidade da FC, variabilidade da PA e barorreflexo espontâneo) em animais SHR. Eles observaram que o tratamento com AVE 0991 (20 mg/kg/dia, via ração) aboliu o aumento noturno na PA, mas o número de ativações do barorreflexo foi menor nos grupos tratados com AVE 0991 do que no grupo controle. Apesar de já bem estabelecido na literatura e em nosso presente estudo, os benefícios de Ang-(1-7) sobre o sistema cardiovascular, esse estudo de Wessel e colaboradores (2007) sugerem efeitos não benéficos induzidos por esse heptapetídeo sobre o ritmo circadiano e sobre a ativação espontânea do barorreflexo. No entanto, é importante ressaltar que nesse estudo foi avaliada a sensibilidade barorreflexa espontânea em ratos SHR, não possibilitando uma comparação direta com nosso estudo.

A HVE pode ser induzida pela hipertensão e consiste em um processo adaptativo funcional em resposta à elevação da PA periférica. Ao ser submetido a uma sobrecarga de pressão o VE tende a dilatar como resposta inicial visando otimização do processo contrátil. Tal processo acarreta uma elevação no estresse da parede ventricular, levando a uma resposta fibrótica além de hipertrofia das fibras do VE. Essa hipertrofia quando acompanhada de fibrose, durante o remodelamento é um processo patológico que pode levar a perda de função (Schaper, 1998). Nesse processo, a Ang II contribui para o remodelamento cardíaco pelo estímulo da hipertrofia dos miócitos e proliferação do fibroblasto (Kawano e cols., 2000; Gonzalez e cols., 2002; Pitt e cols., 2003) De maneira oposta, a Ang-(1-7) age contra-regulando esses efeitos por ser um peptídeo com perfil antitrófico e antifibrótico (Grobe e cols., 2007; Pei e cols., 2010).

Ang-(1-7) pode ser sintetizada no coração (Zisman, 2003) e já está bem definido na literatura que a Ang-(1-7) exerce efeitos benéficos no coração através da redução do remodelamento cardíaco e também da correção de arritmias cardíacas (Ferreira e cols., 2001; Tallant e cols., 2005; Grobe e cols., 2006; Trask e Ferrario, 2007).

Em nosso presente trabalho o peso úmido relativo do coração (peso do coração em relação ao peso corporal) dos animais com hipertensão renovascular tratados com AVE na dose 3 mg/kg foi inferior aos demais grupos de ratos hipertensos. Adicionalmente, o AVE 0991 reduziu a espessura das fibras miocárdicas do ventrículo esquerdo nos grupos tratados na dose 1 ou 3 mg/kg em relação aos animais hipertensos tratados com o veículo KOH. Além disso, o tratamento com AVE 0991 nas doses 1 ou 3 mg/kg reduziu o número de células inflamatórias no coração nos ratos com HRV. Além disso, em relação à fibrose cardíaca, avaliada através da detecção de colágeno, o grupo hipertenso 2R1C KOH apresentou valores superiores aos encontrados nos demais grupos SHAM ou 2R1C, tratados com AVE 0991 (nas doses de 1 ou 3 mg/kg), reforçando as possibilidades terapêuticas de uso do AVE.

O aumento do peso do coração nos animais com hipertensão renovascular observados em nosso estudo pode ser atribuído à hipertrofia das fibras miocárdicas do ventrículo esquerdo, confirmado pela histologia. Este achado está de acordo com os dados da literatura (Hunter e Chien, 1999; Piratello e cols., 2010) e de nosso laboratório (Soares e cols., 2011) que mostram que a hipertrofia ventricular esquerda pode ser induzida pela hipertensão como uma resposta adaptativa à sobrecarga pressórica imposta ao ventrículo esquerdo

Os estudos da literatura que avaliaram o efeito da infusão da Ang-(1-7) na hipertrofia cardíaca mostraram resultados semelhantes aos nossos. Loot e colaboradores (2002), em ratos com insuficiência cardíaca, observaram que o tratamento crônico com infusão de Ang-(1-7) (24µg/kg) através de minibombas preservou a função cardíaca, a perfusão coronária e a função endotelial aórtica em resposta a ligação da artéria coronária em ratos SD. Adicionalmente, Tallant e colaboradores (2005) utilizando um modelo de cultura de cardiomiócitos, demonstraram que a Ang-(1-7) previne a hipertrofia cardíaca e Iwata e cols. (2005), em um modelo *in vitro* de fibroblasto cardíaco, demonstraram os efeitos da Ang-(1-7) na redução da fibrose. Grobe e colaboradores (2007) mostraram que a infusão crônica de Ang-(1-7) (100 ng.kg⁻¹.min⁻¹

¹.seg) por minibombas de infusão preveniu o remodelamento cardíaco induzido pela infusão de Ang II e observaram uma significativa atenuação na hipertrofia das fibras miocárdicas do VE e da fibrose intersticial, porém, ao avaliarem a massa ventricular, eles não observaram diferenças entre os grupos. Pei e colaboradores (2010) também avaliaram os efeitos do tratamento com Ang-(1-7) (24 µg/kg) através de minibombas osmóticas por 24 semanas, em animais SHR de 8 semanas de idade e observaram que a Ang-(1-7) atenuou a hipertrofia cardíaca e a deposição de colágeno induzida pela hipertensão.

Outros autores avaliaram o efeito do AVE 0991 no remodelamento cardíaco, e, assim como nos estudos que usaram a infusão de Ang-(1-7), os resultados foram semelhantes aos nossos dados do presente estudo. Benter e colaboradores (2006) avaliaram os efeitos do tratamento crônico com AVE 0991 (24 µg.kg⁻¹.h⁻¹, ip) e Ang-(1-7) (24 µg.kg⁻¹.h⁻¹, ip) sobre os níveis basais de PA e os danos induzidos pela hipertensão aos órgãos-alvo em ratos SHR tratados com o inibidor da óxido nítrico sintase L-NAME. Esses autores mostraram que AVE e Ang-(1-7) foram equipotentes em reduzir a hipertrofia e deposição de colágeno cardíaco. Ferreira e cols. (2007a) mostraram os efeitos do tratamento com AVE 0991 (1 mg/kg) por uma semana no desenvolvimento da insuficiência cardíaca induzida pela ligação da artéria coronária esquerda e obtiveram como resultado uma redução da área infartada, além de observarem efeitos benéficos em corações isolados de ratos perfundidos, envolvendo o receptor Mas e a liberação de óxido nítrico. Em outro estudo, Ferreira e colaboradores (2007b) avaliaram os efeitos do tratamento com AVE 0991 (1 mg/kg) por 7 dias usando um modelo de disfunção cardíaca induzida pelo isoproterenol, como resultado, houve uma redução do peso do coração, do diâmetro dos miócitos, além de uma diminuição na deposição do colágeno. Esses trabalhos corroboram nosso resultado em que o AVE 0991 reduziu o número de células inflamatórias e o diâmetro de cardiomiócitos no coração e a deposição de colágeno cardíaco em ratos com hipertensão renovascular 2R1C.

Além disso, Piratello e colaboradores (2010) estudaram a correlação da Ang I, Ang II e Ang-(1-7) na HVE em ratos Wistar e SHR submetidos à desnervação aórtica e seus resultados mostraram que a redução dos níveis de Ang-(1-7) pode contribuir para o desenvolvimento da HVE e concluíram que a disfunção barorreflexa quando associada a alterações no SRA pode ser um fator preditivo para HVE e insuficiência cardíaca. Nossos presentes dados, de maneira semelhante aos de Piratello, evidenciam a ação da

Ang-(1-7) em melhorar a sensibilidade do controle barorreflexo, e em prevenir o desenvolvimento da HVE em ratos 2R1C. Esses efeitos benéficos induzidos pelo AVE são reforçados pela forte correlação inversa encontrada em nosso estudo entre a sensibilidade barorreflexa e o diâmetro de cardiomiócitos (AVE 1 mg, $r=-0,8961$; AVE 3 mg, $r=-0,9856$).

Ao longo do tempo, um grande volume de pesquisas foi conduzido a fim de evidenciar a importância da Ang-(1-7) sobre as estruturas e funções cardiovasculares. Atualmente, após evidências da geração de Ang-(1-7) no rim, estudos sobre a função renal têm emergido como alvo de ações da Ang-(1-7). A maioria dos estudos da literatura evidenciam efeitos da Ang-(1-7) sobre a hemodinâmica e transporte tubular renal.

Existem poucas evidências envolvendo a lesão renal relacionada à hipertensão, e poucos são estudos que avaliaram o papel das angiotensinas em modelos experimentais envolvendo insuficiência renal (Silveira e cols., 2010). Entretanto, a Ang-(1-7) parece ser de grande interesse de estudo uma vez que está altamente expresso no tecido renal (Santos e cols., 2001), podendo ser formada nos rins (Yamada e cols., 1999) e parece ter influência na função renal dependendo do balanço de sódio e água, atividade do nervo renal e atividade do SRA (Ferrario e cols. 1997; Santos e cols., 2000). Como já mencionado anteriormente, Pinheiro e cols. (2004) mostraram que AVE 0991 é um agonista do receptor Mas nos rins, mimetizando, dessa forma, os efeitos da Ang-(1-7) nesse órgão.

Burgelová e colaboradores em 2002 avaliaram um possível papel da Ang-(1-7) na modulação de respostas funcionais renais à infusão de Ang II em ratos normotensos anestesiados. Esses autores observaram que a Ang-(1-7) não preveniu reduções nas taxas de filtração glomerular (TFG) assim como no fluxo plasmático renal (FPR), mas bloqueou as reduções na fração de excreção de sódio induzidas pela Ang II. O bloqueio do receptor da Ang-(1-7) pelo A-779 reduziu a TFG, FPR e a fração de excreção de sódio. Em 2005, esses mesmos autores demonstraram que o bloqueio do receptor da Ang-(1-7), pelo A-779 causou reduções significativas na hemodinâmica renal e reduções na excreção de sódio em ratos com hipertensão renovascular 2R1C. Esses autores concluíram nesse estudo, que durante a hipertensão 2R1C, a Ang-(1-7) contribuir para a hemodinâmica renal e para a função excretória, podendo exercer um

papel renoprotetor. Em conjunto, esses dados sugerem que a Ang-(1-7) exerça efeitos contra regulatórios aos efeitos induzidos pela Ang II nos rins, e esses efeitos ocorrem somente quando há ativação endógena do SRA.

A hipertensão renovascular 2R1C caracteriza-se como um modelo que apresenta hiperatividade do SRA. Na HRV ocorrem aumentos nos níveis de Ang II em ambos os rins, clipado e não clipado, elevando assim os níveis plasmáticos de Ang II, de aldosterona, o tônus simpático e conseqüentemente a PA. Adicionalmente, a produção renal de Ang II modula o transporte de sal e água pelos túbulos renais e a filtração de proteínas através da barreira glomerular, além disso, as ações tróficas da Ang II podem contribuir para a patologia renal em parte, pelo aumento na deposição de colágeno (Ferrario e Varagic, 2010).

Durante a hipertensão renal 2R1C, o rim esquerdo clipado em função da redução do fluxo sanguíneo renal sofre redução em seu peso, enquanto o rim contralateral direito, não clipado, aumenta sua massa e tamanho, provavelmente devido a uma hiperfunção compensatória (Castro e cols., 2011, Rodrigues e cols., 2007; Soares e cols. 2011). Além disso, é observado um aumento na deposição de colágeno, somente no rim esquerdo clipado (Soares e cols., 2011). Nossos resultados mostraram que, similarmente aos estudos citados acima, o rim clipado apresentou uma menor massa em relação ao rim contralateral, não clipado, enquanto o rim contralateral, não clipado, apresentou aumento da massa em relação aos rins dos animais SHAM.

Nossos resultados mostraram que o tratamento com AVE 0991 nas doses 1 e 3 mg/kg produziu efeitos de redução no número de células inflamatórias e no depósito de colágeno no rim esquerdo, clipado, dos animais 2R1C, esses efeitos foram maiores nos animais tratados com AVE 0991 concentração de 3 mg/kg do que na concentração de 1 mg/kg, demonstrando um efeito benéfico do AVE 0991 nesse modelo de hipertensão renal, na redução da fibrose e na inflamação. Nossos dados corroboram os dados de Pinheiro e colaboradores (2009), que ao avaliarem os efeitos do receptor da Ang-(1-7), Mas, na fisiologia e morfologia renal usando ratos com deleção genética para esse receptor, observaram um aumento na expressão de colágeno IV e fibronectina nas áreas mesangiais e intersticiais e um aumento de colágeno III no interstício. Essas alterações fibrinogênicas foram associadas a um *upregulation* do receptor AT1 e transformação do fator de crescimento beta mRNA, sugerindo que o receptor Mas age como um regulador

da fibrogênese renal, controlando os efeitos de transdução dos receptores AT₁ nos rins. Similarmente a este estudo citado de Pinheiro e colaboradores (2009), o tratamento com AVE na dose 3 mg/kg preveniu a fibrose do rim clipado em ratos com hipertensão renovascular, mostrando um papel anti-fibrótico da Ang-(1-7) no rim clipado.

Um estudo recente de Prieto e colaboradores (2011) avaliou as alterações no balanço entre ECA/Ang II e ECA2/Ang-(1-7) durante hipertensão renovascular 2R1C (três semanas), em ambos os rins, clipado e não clipado, nas regiões medular e cortical. Nesse estudo esses autores observaram que a atividade da renina plasmática estava aumentada nos ratos 2R1C comparados aos ratos SHAM. Adicionalmente, os níveis de Ang I e Ang II estavam aumentados enquanto os níveis de Ang-(1-7) estavam reduzidos em ambos os rins, clipado e não clipado, em relação aos ratos SHAM. Porém, os níveis de Ang II eram significativamente mais elevados no rim clipado do que no rim não clipado. Nas regiões medulares renais, os níveis de mRNA da ECA estavam aumentados, enquanto os níveis de ECA2 estavam diminuídos. A atividade da renina medular foi similar em ambos os rins, clipado e não-clipado nos animais 2R1C em comparação aos SHAM, sugerindo um *upregulation* em ambos os rins, clipado e não clipado, que pode contribuir para a alteração do conteúdo intra-renal de Ang II e Ang-(1-7).

Outros estudos obtiveram resultados corroborando esse achado em que no rim não clipado a formação de Ang II é dependente da ECA (Guan e cols., 1992; Harrison-Bernard e cols., 2001; Sadjadi e cols., 2005a). Porém, em relação ao rim clipado, isquêmico, esse mecanismo de regulação pelo balanço entre ECA/Ang II e ECA2/Ang-(1-7), parece não ser o único mecanismo presente e responsável, uma vez que Sadjadi e colaboradores (2005b) reportaram que o aumento de Ang II no rim clipado está envolvido a outra via de formação, através da enzima quimase, e essa regulação parece ser gerada pela própria isquemia.

No presente estudo foram observadas alterações no número de células inflamatórias e na deposição de colágeno somente no rim esquerdo (clipado), o mesmo não ocorrendo no rim direito (não clipado), nos ratos com hipertensão renovascular. Este fato pode ter como possível explicação a presença de níveis mais elevados de Ang II no rim clipado, do que no rim não clipado (Prieto e cols., 2011) sugerindo que

diferentes níveis renais de Ang II relacionam-se a distintos efeitos desse octapeptídeo em relação à fibrose renal.

Sumarizando, os principais achados de nosso estudo sugerem que o tratamento com AVE 0991 pode alterar os valores da PA, de forma diferente, conforme a dose utilizada, além de prevenir o remodelamento cardíaco e renal nos animais com hipertensão renovascular. O tratamento com AVE 0991 na dose 3mg/kg, reduziu os níveis de PAM basal dos ratos com hipertensão renovascular, embora não tenha abolido a hipertensão, visto que a PAM basal desse grupo de animais foi superior à PAM dos animais normotensos SHAM. Já na dose 1mg/kg, o AVE 0991 não se mostrou eficaz em reduzir os níveis basais da PAM nos ratos com hipertensão renovascular. Em relação à sensibilidade do controle reflexo da FC, o AVE 0991 na dose 3 mg/kg restaurou a sensibilidade do controle reflexo da FC, tanto sobre os componentes bradicárdico como sobre o componente taquicárdico, para níveis normais em comparação aos ratos normotensos. Entretanto, na dose 1 mg/kg apresentou melhora da sensibilidade barorreflexa somente em relação ao componente taquicárdico, no ratos com hipertensão renovascular. Adicionalmente, o AVE 0991 em ambas as doses, 1 ou 3 mg/kg, reduziu o número de células inflamatórias, a espessura das fibras miocárdicas dos animais hipertensos 2R1C em relação aos animais normotensos SHAM, além disso, o tratamento com AVE 0991 preveniu o desenvolvimento de fibrose cardíaca e renal nos animais hipertensos 2R1C em ambas as doses de 1 e 3 mg/kg.

7 Conclusão

Nossos dados em conjunto mostraram que o tratamento com AVE 0991 apresenta um papel anti-trófico e anti-fibrótico, e induz melhora da sensibilidade barorreflexa em animais com hipertensão renovascular 2R1C. Além disso, o tratamento com AVE nas doses 1 e 3mg/kg apresentou efeitos diferentes sobre os níveis basais de PA, podendo o AVE ser uma importante ferramenta em doenças com níveis aumentados ou não de PA, como a hipertensão arterial e a insuficiência cardíaca.

8 Referências

Akabane, S.; Natsume, T.; Matsushima, Y.; Deguchi, F.; Kuramochi, M.; Ito, K. Alterations in renal NA+K+ATPase activity and ouabain binding in Goldblatt hypertensive rabbits. J. Hypertens., v.3, n.5, p.469-474. 1985.

Appenrodt, E.; Brattstrom, A. Effects of central Angiotensin II and Angiotensin III on baroreflex regulation. Neuropeptides, v.26, n.3, p.175-80. 1994.

Benter, I. F.; Diz, D. I.; Ferrario, C. M. Cardiovascular actions of Angiotensin-(1-7). Peptides, v.14, p.679-84. 1993.

Benter, I. F.; Ferrario, C. M.; Morris, M.; Diz, D. I. Antihypertensive actions of Angiotensin-(1-7) in Spontaneously Hypertensive Rats. Am J Physiol, v.269, p.H313-9. 1995.

Benter, I. F.; Yousif, M. H.; Anim, J. T.; Cojocel, C.; Diz, D. I. Angiotensin-(1-7) prevents development of severe hypertension and end-organ damage in Spontaneously Hypertensive Rats treated with L-Name. Am J Physiol, v.290, p.H684-H691. 2006.

Bortolotto, L. A. E; Malachias, M. V. B. New concepts on the diagnosis and treatment of secondary hypertension. Rev Bras Hipertens, vol.18, n.2, p.46-66. 2011.

Braam, B.; Navar, L. G.; Mitchell, K. D. Modulation of tubuloglomerular feedback by Angiotensin II Type 1 Receptors during the development of Goldblatt Hypertension. Hypertension, v.25, n.6, p.1232-7. 1995.

Brasier, A. R.; Recimos III; A.; Eledrisi, M. S. Vascular inflammation and the Renin-Angiotensin System. Atherosclerosis, Thrombosis And Vascular Biology. v.22, p.1257-1266. 2002.

Britto, R. R.; Santos, R. A. S.; Fagundes-Moura, C. M.; Khosla, M. C.; Campagnole-Santos. Role Of Angiotensin-(1-7) in the Modulation of the Baroreflex in Renovascular Hypertensive Rats. Hypertension, v.30, p.549-56. 1997.

Brum P. C.; Da Silva, G. J.; Moreira, E. D.; Ida, F.; Negrao, C. E.; Krieger, E. M. Exercise training increases baroreceptor gain sensitivity in normal and Hypertensive Rats. Hypertension, v.36, p.1018-1022. 2000.

Bürgelová, M.; Kramer, H. J.; Teplan, V., Velicková, G.; Vítko, S.; Heller, J.; Malý, J.; Cervenka, L. Intrarenal infusion of Angiotensin-(1-7) modulates renal functional responses to exogenous Angiotensin II in the rat. Kidney Blood Press Res. v.25, n.4, p.202-10. 2002.

Bürgelová, M.; Kramer, H. J.; Teplan, V.; Thumová, M.; Cervenka, L. Effects of Angiotensin-(1-7) blockade on renal function in rats with enhanced intrarenal Ang II activity. Kidney Internacional, v.67; p.1453-1461. 2005.

Bürgelová, M.; Vanourlová, Z; Thumová, M.; Dvorák, P.; Opocensky, M., Kramer, H. J.; Zelizko, M.; Malý, J.; Bader, M.; Cervenka, L. Impairment of the angiotensin-converting enzyme 2-Angiotensin-(1-7)-mas axis contributes to the acceleration of the Two-Kidney, one-clip Goldblatt Hypertension. Journal Of Hypertension, v.27, p. 1988-2000. 2009.

Brum, P.C.; Silva, G. J. J.; Moreira, E. D.; Ida, F.; Negrão, C. E.; Krieger, E. M. Exercise training increases baroreceptor gain sensitivity in normal and hypertensive rats. Hypertension, v.36, p.1018-1022. 2000.

Campagnole-Santos, M.J., Heringer, S. B., Batista E. M., Khosla, M. C., Santos, R. A. S. Differential baroreceptor reflex modulation by centrally infused angiotensin peptides. Am J Physiol, v.263, p.89-94. 1992.

Campagnole-Santos, M. J.; Haibara, A. S. Reflexos cardiovasculares e pressão arterial. Rev Bras Hipertens,v.8, p.30-40. 2001.

Cangussu, L. M.; De Castro, U. G.; Do Pilar Machado, R.; Silva, M. E.; Ferreira, P. M.; Dos Santos, R. A.; Campagnole-Santos, M. J.; Alzamora, A. C. Angiotensin-(1-7) antagonist, A-779, microinjection into the caudal ventrolateral medulla of Renovascular Hypertensive Rats restores baroreflex bradycardia. Peptides, v.30, n.10, p.1921-7. 2009.

Casadei, B.; Paterson, D. J. Should We Still Use Nitrovasodilators To Test Baroreflex Sensitivity?. Jornal of Hypertension, v.17, p.3-6. 1999.

Castro, R.; Phillips, M. I. Neuropeptide action in nucleus tractus solitarius: angiotensin specificity and hypertensive rats. Am J Physiol, v.249, p.R341-347. 1986.

Ceroni, A.; Char, L. J.; Bombein, R. L.; Michelini, L. C. Chronic absence of baroreceptor inputs prevents training-induced cardiovascular adjustments in normotensive and spontaneously hypertensive rats. Exp Physiol, v.94, p.630-640. 2009

Chaves, G. Z.; Caligiorne, S.M.; Santos, R. A.; Khosla, M.C.; Campagnole-Santos, M. J. Modulation of the baroreflex control of heart rate by Angiotensin-(1-7) at the nucleus tractus solitary of normotensive and spontaneously hypertensive rats. J Hypertens, v.18, p.1841-1848. 2000.

Constanzo, L. S. Fisiologia. Rio De Janeiro: Guanabara Koogan, 1999.

Donogue, M.; Hsieh, F.; Baronas, E. e cols. A Novel Angiotensin-Converting Enzyme-related Caboxypeptidase (ECA2) converts Angiotensin I to Angiotensin-(1-9). Circ. Res, v.87, p.E1-E9. 2000.

Eckberg, D. L. Carotid baroreflex function in young men with borderline blood pressure elevation. Circulation, v.59, p.632-6. 1979.

Faria-Silva, R.; Duarte, F. V.; Santos, R. A. S. Short-term angiotensin-(1-7) receptor mas stimulation improves endotelial function in normotensive rats. Hypertension, v.46, p. 948-952. 2005.

Fei, L.; Anderson, M. H.; Katritsi, D. Sneddon, J.; Startes, D. J.; Malik, M.; Camm; A.J. decreased heart rate variability in survivors of sudden death not associated with coronary artery disease. British Heart Journal, v.71, p. 16-21. 1994.

Ferrario C.M. importance of renin-angiotensin-aldosterone system in the physiology and pathology of hypertension. Drugs, v.39, n.2, p.1-8. 1990.

Ferrario, C. M.; Chapell, M.C.; Tallant, E. A.; Brosniham K. B.; Diz, D. I. Counterregulatory Actions Of Angiotensin-(1-7). Hypertension, v. 30, p.1-9. 1997.

Ferrario, C. M. Contribution of angiotensin-(1-7) to cardiovascular physiology and pathology. Curr Hypertens Rep. V. 5. N.2 . P. 129-34. 2003.

Ferrario, C. M.; Trask, A. J.; Jessup, J. A. Advances in biochemical and functional roles of angiotensin-converting enzyme 2 and angiotensin-(1-7) in regulation of cardiovascular function. Am J Physiol Heart Circ Physiol, v.289, p.2281-2290. 2005.

Ferrario, C. M.; Varagic, J. The Ang-(1-7)/Ace2/Mas Axis in the regulation of nephron function. Am J Physiol Renal Physiol, v.298, n.6, p.F1297-305. 2010.

Ferreira, A. J.; Jacoby, B. A.; Araújo, C. A. A.; Macedo, F. A. F. F.; Silva, G. A. B.; Almeida, A. P.; Caliari, M. V.; Santos, R. A. S. The nonpeptide angiotensin-(1-7) receptor mas agonist AVE 0991 attenuates heart failure induced by miocardial infarction. Am J Physiol Heart Circ Physiol, v.292. p.H1113-H1119. 2007a.

Ferreira, A. J.; Oliveira, T. L.; Castro, M. C. M.; Almeida, A. P.; Castro, C. H.; Caliari, M. V.; Gava, E.; Kitten G. T.; Santos, R. A. S. Isoproterenol-induced impairment of heart function and remodeling are attenuated by the angiotensin-(1-7) analogue AVE 0991. Life Sciences, v.81, p.916-923, 2007b.

Freeman, E. J.; Chisolm, G. M.; Ferrario, C. M.; Tallant, E. A. Angiotensin (1-7) inhibits vascular smooth muscle cell growth. Hypertension, v.28, n.1, p.104-8. 1996.

Frohlich, E.D.; Navar, L.G.; Re, R.N. Hypertension: The Present Years. Hypertension, v.33, p.1097-8. 1999.

Gallinat, S.; Busche, S.; Raizada, M. K.; Summers, C. The angiotensin ii type 2 receptor: an enigma with multiple variations. Am J Physiol Endocrinol Metab. v.278, n.3, p.E357-74. 2000.

Gasparo, M.; Catt, K. J.; Inagami, T.; Wright, J. W.; Unger, T. H. International Union Of Pharmacology. XXIII. The Angiotensin II Receptors. Pharmacol Rev, v.52, p.415–472. 2000.

Gonzalez, A.; Lopez, B.; Querejeta, R.; Diez, J. Regulation of miocardial fibrilar collagen by Angiotensin II. A Role In Hypertensive Heart Disease? J. Mol.Cell Cardiol. vol.34, p.1585-1593. 2002.

Goldblatt, H.; Lynch, J.; Hanzal, R. F.; Summerville, W. W. Studies on experimental hypertension I. The production of persistent elevation of systolic blood pressure by means of renal ischemia. J Exp Med, v.59, n.3: p.347-379. 1934.

Guan, S.; Fox, J.; Mitchell, K. D.; Navar, L. G. Angiotensin and angiotensin converting enzyme tissue levels in two-kidney, one clip hypertensive rats. Hypertension, v.20, n.6, p.763-7. 1992.

Guyton A. C. Fisiologia Humana. 6 Ed. Rio De Janeiro: Guanabara, 1985.

Grobe, J. L.; Mecca, A. P.; Lingis, M.; Shenoy, V.; Bolton, T. A.; Machado, J. M.; Speth, R. C.; Raizada, M. K.; Katovich, M. J. Prevention of angiotensin II-induced cardiac remodeling by angiotensin-(1-7). Am J. Physiol Heart Circ Physiol. v.292, p.H736-H742. 2007.

Hammond Iw, Devereux Rb, Alderman Mh, Laragh Jh. Relation of blood pressure and body build to left ventricular mass in normotensive and hypertensive employed adults. J Am Coll Cardiol, v.12, p.996-1004. 1988.

Harrison-Bernard, L. M.; Zhuo, J.; Kobori, H.; Ohishi, M.; Navar, L. G. Intrarenal At₁ receptor and ACE binding in Angiotensin II-Induced Hypertension Rats. Am J Physiol Renal Physiol, v.281, p.F19-F25. 2001.

Head, G. A. Role of AT₁ receptors in the central control of sympathetic vasomotor function. Clin Exp. Pharmacol and Physiol, v.3, p.S93-98. 1996.

Heringer-Walther, S., Batista, E. N., Walther, T., Khosla, M. C., Santos, R. A. S., Campagnole-Santos, M. J. Baroreflex improvement in SHR after ACE inhibition involves angiotensin-(1-7). Hypertension, v.37, p.1309-1314. 2001.

Hogan, N.; Casadei, B.; And Paterson, D. J. Nitric oxide donors can increase heart rate independent of autonomic activation. J Appl Physiol, v.87, p.97-103, 1999.

Huang, W. C.; Ploth, D. W. E; Navar, L. G. Angiotensin-mediated alterations in nephron function in Goldblatt Hypertensive Rats. Am J Physiol, v.243, n.6, p.F553-60. 1982.

Iyer, S. N.; Ferrario, C. M.; Chapell, M. C. Angiotensin-(1-7) contributes to the antihypertensive effects of blockade of renin-angiotensin system. Hypertension, v.31, p.356-361. 1998.

Iwata, M.; Cowling, R. T.; Gurantz, D.; Moore, C.; Zhang, S.; Yuan, J. X.; Greenberg, B. H. Angiotensin-(1-7) binds to specific receptors on cardiac fibroblasts to initiate antifibrotic and antitrophic effects. Am J Physiol Heart Circ Physiol, v.289, p.2356-H2363. 2005.

Kaschina, E. E.; Unger, T. Angiotensin AT₁/AT₂ Receptors: Regulation, Signalling And Function. Blood Press, v.12, n.2, p.70-88. 2003.

Kawano, H.; Do, Y. S.; Kawano, Y., Starnes, V.; Barr, M.; Law, R.E.; Hsueh W. A. Angiotensin II has multiple profibrotic effects in human cardiac fibroblasts. Circulating. v.101, p.1130-1137. 2000.

Kim, S.; Iwao, H. Molecular and cellular mechanisms of Angiotensin II mediated Cardiovascular and Renal Diseases. Pharmacological Reviews, v.52, p.11-34. 2000.

Klag M. J.; Whelton, P. K.; Randall, B.L.; Neaton, F. L.; Ford, C.E.; Shulman, N. B.; e cols. Blood Pressure and End-Stage Renal Disease. In Men. Nejm, v.334, n.1, p.13-18. 1996.

Kobori, H.; Nangaku, M.; Navar, L. G.; Nishiyama, A. The intrarenal renin-angiotensin system: from physiology to the pathobiology of hypertension and kidney disease. Pharmacol Rev, v.59, p.251-287. 2007.

Korner, P. I.; West, M. J.; Shaw, J.; Uther, J. S. Steady-state properties of the baroreceptor-heart rate reflex in essential hypertension in man. Clin Exp Pharmacol Physiol, vol.1, p.65-76. 1974.

Kramer, J. M.; Beatty, J. A.; Plowey, E. D.; Waldrop, T. G. Exercise and hypertension: a model for central neural plasticity. Clin Exp Pharmacol Physiol, v.29, p.122-12. 2002.

Kumagai, H., Suzuki, H., Ryuzaki, M., Matsukawa, S. E Saruta, T. Baroreflex control of renal sympathetic nerve activity is potentiated at early phase of two-kidney, one-clip Goldblatt Hypertension in conscious rabbits. Circ Res. v.67, n.6, p.1309-22. 1990.

Kusserow, H.; Unger T. Vasoactive Peptides, Their Receptors and Drug Development. Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology, v.94, p.5-12. 2004.

Lawes, C. M. M.; Vander Hoorn, S.; Rodgers, A. Global burden of blood pressure-related disease, 2001. Lancet; v.371, p.1513–1518. 2008.

Lemos, V. S.; Silva, D. M.; Walther, T.; Alenina, N.; Bader, M.; Santos, R. A. S. The endothelium-dependent vasodilator effect of the nonpeptide ang-(1-7) mimic AVE 0991 is abolished in the aorta of Mas-Knockout mice. Journal of Cardiovascular Pharmacology, v.46, p.274-279. 2005.

Li, P.; Chappell, M. C.; Ferrario, C. M.; Brosnihan, K. B. Angiotensin-(1–7) augments bradykinin-induced vasodilation by competing with ACE and releasing nitric oxide. Hypertension, v.29, p.394–400. 1997.

Liu JI, Kulakofsky J, Zucker Ih. Exercise training enhances baroreflex control of heart rate by a vagal mechanism in rabbits with heart failure. J Appl Physiol; v.92, p.2403-240. 2002.

Ljtic, D.; Kep, P. The role of arterial hypertension in the progression of non-diabetic Glomerular disease. Nephrol Dial Transplant, v.18 (Suppl 5), p.V28-3. 2003.

Marques, F. D.; Ferreira, A. J.; Sinisterra, R. D. M; Jacoby, B. A.; Sousa, F. B.; Caliari, M. V.; Silva, G. A. B.; Melo, M. B.; Nadu, A. P.; Souza, L. E.; Irigoyen, M. C. C.; Almeida, A. P.; Santos, R. A. S. An oral formulation of angiotensin-(1-7) produces cardioprotective effects in infarcted and isoproterenol-treated rats. Hypertension, v.57, p.477-483. 2011.

Matsumura, Y., Hasser, E. M. E Bishop, V. S. Central effect of angiotensin II on baroreflex regulation in conscious rabbits. Am J Physiol, v.256, n.3, p.R694-700. 1989.

Mccubbin, J. W.; Green, J. H.; Page, I. H. Baroreceptor function in chronic renal hypertension. Circ Res, vol.4, p.205-11. 1956.

Mckitrick, D.J.; Calerresu, F. R. Reciprocal connection between nucleus ambiguus and caudal ventrolateral medulla. Brain Research, v.742, p.203-210. 1997

Minami N, Yoshikawa T, Kataoka H, Mori N, Nagasaka M, Kurosawa H, e cols. Effects of exercise and beta-blocker on blood pressure and baroreflexes in Spontaneously Hypertensive Rats. Am J Hypertens. 2003; 16: 966-97.

Moraes-Silva, I. C.; De La Fuente, R. N.; Mostarda, C.; Rosa, K.; Flues, K.; Damaceno-Rodrigues, N. R.; e cols. Baroreflex deficit blunts exercise training-induced

cardiovascular and autonomic adaptations in hypertensive rats. Clin Exp Pharmacol Physiol; v.37, p.E114-E120. 2010.

Moreira, E. D.; Ida, F.; Krieger, E. M. Reversibility of baroreceptor hyposensitivity during reversal of hypertension. Hypertension, v.15, p.791-796. 1990.

Musialek, P.; Casadei, B. Nitrovasodilators and heart rate: more than the arterial baroreflex. Cardiovascular Research, v.47, p.404-405. 2000.

Navar, L. G., Zou, L., Von Thun, A., Tarng Wang, C., Imig, J. D. E Mitchell, K. D. Unraveling the mystery of Goldblatt Hypertension. News Physiol Sci, v.13: p.170-176. 1998.

Obayashi, M., Yano, M., Kohno, M., Kobayashi, S., Tanigawa, T., Hironaka, K., Ryouke, T. E Matsuzaki, M. Dose-dependent effect of Ang II-receptor antagonist on myocyte remodeling in rat cardiac hypertrophy. Am J Physiol, v.273, n.4, Pt 2, p.H1824-31. 1997.

Oliveira, M.A; Fortes, Z.B.; Santos, R.A.S; Kosla, M.C.; De Carvalho M.H. Synergistic effect of angiotensin-(1-7) on bradykinin arteriolar dilation *In Vivo*. Peptides, v. 20, p. 1195-1201. 1999.

Paula, R. D.; Lima, C.V.; Khosla, M.C.; Santos, R.A.S. Angiotensin-(1-7) potentiates the hypotensive effect of bradykinin in conscious rats. Hypertension, v.26, p.1154-1159. 1995.

Pei, Z.; Meng, R.; Li, G.; Yan, G.; Xu, C.; Zhaung, Z.; Ren, J.; Wu, Z. Angiotensin-(1-7) ameliorates remodeling and interstitial fibrosis in spontaneous hypertension: role of mmps/timps. Toxicology Letters, v.199, p.173-181. 2010.

Pinheiro S. V.; Simões E Silva, A. C.; Sampaio, W. O.; Paula, R. D.; Mendes, E. P.; Bontempo E. D.; Pesquero, J. B.; Walther, T.; Alenina N.; Bader, M.; Bleich, M.;

Santos, R. A. S. Nonpeptide AVE 0991 is an angiotensin-(1-7) receptor Mas agonist in the mouse kidney. Hypertension, v.44, p.490-496. 2004.

Pinheiro, S. V.; Ferreira, A. J.; Kitten, G. T.; Da Silveira, K. D.; Da Silva, D. A.; Santos, S.H.; Gava, E.; Castro, C. H.; Magalhães, J. A.; Da Mota, R. K.; Botelho-Santos, G. A.; Bader, M., Alenina, Santos, R. A. S., Simoes e Silva, A. C. Genetic deletion of the Angiotensin-(1-7) receptor Mas leads to glomerular hiperfiltration and microalbuminuria. Kidney Int. v.75, n.11, p.1184-93. 2009

Pinto, Y. M.; Paul, M.; Ganten, D. Lessons from rat models of hypertension: from Goldblatt to genetic engineering. Cardiovasc. Res. v.39, n.1, p.77-88. 1998.

Piratello, A. C.; Moraes-Silva, I.; Paulini, J.; Souza, P. R.; Sirvente, R.; Salemi, V.; Flues, K.; Moreira, E. D.; Mostarda, C.; Cunha, T.; Casarini, D. E. Renin angiotensin system and cardiac hypertrophy after sinoaortic denervation in rats. Clinics, v.65. n.12, p.1345-1350. 2010.

Pitt, B.; Reichek, N.; Willenbrock, R.; Zannad, F.; Phillips, R. A.; Ronicker, B.; Kleima, J.; Krause, S.; Burns, D.; Williams, G. H. Effects of Eplerenome, Enalapril, Eplerone/Enalapril in patients with essential hypertension and left ventricular hypertrophy: The 4e-Left Ventricular Hypertrophy Study. Circulation, v.108; p.1831-1838. 2003.

Ploth D.H. Angiotensin-Dependent Renal Mechanism in Two-Kidney, One Clip Renal Vascular Hypertension. Am J Physiol, v.245, p.F131-141. 1983

Polson, W.; Dampney, R.A.L.; Boscan, P.; Pickering, A.E.; Paton, J.F.R. differential baroreflex control of sympathetic drive by angiotensin ii in the nucleus tractus solitari. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.; v.293, p.1954-1960. 2007.

Prieto, M. C.; Gonzalez-Villalobos, R. A.; Botros, F.T.; Martin, V. L.; Pagán, J.; Satou, R.; Lara, L. S.; Feng, Y.; Fernandes, F. B.; Kobori, H.; Casarini, D. E.; Navar. Reciprocal Changes in renal ACE/AngII And ACE2/Ang-(1-7) are associates with

enhanced collecting duct renin in Goldblatt Hypertensive Rats. Am J Physiol Renal Physiol. v.300. p.F749-F755. 2011.

Reid, I. A; Morris, B. J.; Ganong, W. F. The Renin Angiotensin System. Annual Review Of Physiology, v.40, p.377-410. 1978.

Rodrigues, M.C.; Campagnole-Santos, M. J.; Machado, R. P.; Silva, M. E.; Rocha, J.L.M.; Ferreira, P. M.; e cols. Evidence for a role of AT2 receptors at the CVLM in the cardiovascular changes induced by low-intensity physical activity in Renovascular Hypertensive Rats. Peptides, v.28, p.1375-1382. 2007.

Sampaio, W.O.; Nascimento A. A.; Santos, R. A. S. Systemic and regional hemodynamic effects os angiotensin-(1-7) in rats. American Journal Of Physiology, Heart And Circulation. v.284, n.6, p.1985-1994. 2003.

Santos, R. A. S.; Campagnole-Santos, M. J. Central and peripheral actions of angiotensin-(1-7). Braz. J. Med. Biol. Res, v.27, n.4, p.1033-47. 1994.

Santos, R.A.S., Campagnole-Santos, M. J.; Andrade, S. P. Angiotensin-(1-7): An Update. Regulatory Peptides, v.91, p.45-62. 2000.

Santos, R. A. S.; Passaglio, K. T.; Bader, M.; Pesquero, J. B.; Simões E Silva, A. C. Interactions between Angiotensin-(1-7), kinins, and Angiotensin II in kidney and blood vessels. Hypertension, v.38, p.660-664. 2001.

Santos, R.A.S; Simões E Silva, A.C; e cols. Angiotensin-(1-7) is an endogenous ligand for the G protein-coupled receptor Mas. Proc Natl Acad Sci U S A., v.100, n.14, p.8258-63. 2003

Santos, R. A. S.; Ferreira, A. J. Pharmacological Effects Of Ave 0991, A Nonpeptide Angiotensin-(1-7) Receptor Agonist. Cardiovascular Drug Reviews, v.24, n.3-4, p.239-246. 2006.

Sadjadi, J.; Puttapparthi, K.; Li, L. E Cols. Upregulation of autocrine-paracrine renin-angiotensin systems in chronic renovascular hypertension. J Vasc Surg, v.36, P. 386. 2002.

Sadjadi J.; Kramer, G. L.; Yu, C.H.; Burrell Welborn, M. 3rd, Chappell, M.C., Gregory Modrall, J. Angiotensin converting enzyme-independent Angiotensin II production by chymase is up-regulated in the ischemic kidney in Renovascular Hypertension. J Surg Res, v.127, n.2, p.65-9. 2005a.

Sadjadi, J.; Kramer, G. L.; Yu, C. H.; Welborn, M. B.; Modrall, J. G. Angiotensin II exerts positive feedback on the intrarenal renin-angiotensin system by an angiotensin converting enzyme-dependent mechanism. J Surg Res. v.129, n.2, p.272-7. 2005 b.

Savage, D. D.; Drayer, J. I. M.; Henry, W. L. Echocardiographic assessment of cardiac anatomy and function in hypertensive subjects. Circulation; v. 59, p.623-32. 1979.

Sbh (Sociedade Brasileira De Hipertensão). VI Diretrizes Brasileiras De Hipertensão Arterial. Arq Bras Cardiol, v.95 (Supl.1), p.1-51. 2010.

Schaper, J. Effect of multiple ischemic events on human myocardium: an ultrastructural study. European Heart Journal, v.9, p.141-149, 1998.

Seyedi N, Xu X, Nasjletti A, Hintze Th. Coronary Kinin generation mediates nitric oxide release after angiotensin receptor stimulation. Hypertension; v.26, p.164–70. 1995.

Simões E Silva, A. C.; Diniz J. S.; Regueira F. A., Santos , R. A. The Renin Angiotensin System in Childhood Hypertension. Journal Of Pediatrics, v.145, p.93-98, 2004.

Silveira, K. D.; Bosco, K. S. P.; Diniz, L. R. L.; Carmona, A. K.; Cassali, G. D.; Bruna-Romero, O.; Sousa, L. P.; Teixeira, M. M.; Santos, R. A. S.; Simões E Silva, A. C.;

Vieira, M. R. ACE2–Angiotensin-(1–7)–Mas axis in renal ischaemia/reperfusion injury In Rats. Clinical Science, v.119, p.385–394. 2010.

Souza, C. N.; Breda, L. C. D.; Aguiar, C. F.; Custódio, F. B.; Machado, J. R.; Silva Abate, D. T. R.; Llaguno, M. M.; Reis, M. A.; Faleiros, A. C. G. Clinical analysis and quantification of heart and kidney fibrosis in hypertensive patients with or without stroke. Rev Bras Hipertens, vol.17, n.2, p.87-91, 2010.

Soares, E. R.; Lima, W. G.; Machado, R. P.; Carneiro, C. M.; Silva, M. E.; Rodrigues, M. C.; Castro, U. G.; Santos, R. A. S.; Campagnole-Santos, M. J.; Alzamora, A. C. Cardiac and renal effects induced by diferente exercise workloads in renovascular hypertensive rats. Brazilian Journal Of Medical And Biological Research, v.44, p.573-582. 2011.

Suzuki, J.; Matsubara, H.; Urakami, M.; Inada, M. Rat Angiotensin II (Type 1a) Receptor mRNA regulation and subtype expression in myocardial growth and hypertrophy. Circ Res. v.73, n.3, p.439-47. 1993.

Tallant, E. A.; Ferrario, C. M.; Gallagher, P. E. Angiotensin-(1-7) inhibits growth of cardiac myocytes through activation of the Mas receptor. Am J Physiol Heart Circ Physiol, v.289, p.H1560-H1566. 2005.

Tipnis, S.R.; Hooper, N. M.; Hyde, R.; Karram, E.; Christie, G.; Turner, A. J. A human homolog of angiotensin-converting enzyme. Cloning and functional expression as a captopril-insensitive carboxypeptidase. J Biol Chem, v.275, p.33238-33243. 2000.

Toton-Zuranska, J.; Gajda, M.; Pyka-Fosciak, G.; Kus, K.; Pawlowska, M.; Niepsuj, A.; Wolkow1, P.; Olszanecki1, R.; Jawien, J.; Korbut., R. AVE 0991 - angiotensin-(1-7) receptor agonist, inhibits atherogenesis in ApoE - knockout mice. Journal Of Physiology And Pharmacology, v.61, n.2, p.181-183j. 2010.

Vickers, C.; Hales, P.; Kaushik V. E. Cols. Hidrolysis of biological peptides by human angiotensin-converting enzyme-related carboxypeptidase. J. Biol. Chem. v.277, p.14838-14843. 2002

Von Thun, A. M., Vari, R. C.; El-Dahr, S. S.; Navar, L. G. Augmentation of intrarenal angiotensin II levels by chronic Angiotensin II infusion. Am J Physiol, v.266, p.F120–F128. 1994.

Williams B. The Year In Hypertension. Jacc; v.55, n.1, p.66–73. 2010.

Yamada, K.; Iyer, S.N.; Chapel, M. C.; Brosnihan, K. B.; Fukuhara, M.; Ferrario, C.M. differential response of angiotensin peptides in the urine of hypertensive animals. Regulatory Peptides, v.80, p.57-66. 1999.

Zou, L. K., Hymel, A.; Imig, J. D.; Navar L. G. Renal accumulation of circulating Angiotensin II in Angiotensin II-infused rats. Hypertension, v.27, p.658–662. 1996.

Zeng, W; Chen, W; Leng, X; Tang, L.; Sun, X.; Li, C.; Dai, G. Impairment of cardiac function and remodeling induced by myocardial infarction in rats are attenuated by the nonpeptide angiotensin-(1-7) analog AVE 0991. Cardiovascular Therapeutics, p.1-10, 2010.

Zisman, L.S.; Meixell, G.E.; Bristow, M. R.; Canver, C.C. angiotensin-(1–7) formation in the intact human heart: *in vivo* dependence on Angiotensin II as substrate. Circulation v.108, p.1679-1681. 2003.

Wessel, N.; Malberg, H.; Heringuer-Walther, S.; Schultheiss, H. P.; Walther, T. The Angiotensin-(1-7) receptor agonist AVE 0991 dominates the circadian rhythm and baroreflex in Spontaneously Hypertensive Rats. J Cardiovasc Pharmacol, v.49, n.2, p.67-73. 2007.

Wiemer, G; Dobrucki, L.W.; Louka, F. R.; Malinski, T.; Heitsch, H. AVE 0991, a nonpeptide mimic of the effects of angiotensin-(1-7) on the endothelium. Hypertension, v.40, p.847-852. 2002.