



UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE BIOTECNOLOGIA
BACHARELADO EM BIOTECNOLOGIA

**AÇÕES DA ANGIOTENSINA-(1-7) NA REGENERAÇÃO
CARDÍACA DE RATOS**

RENATA LIRA DE ASSIS

JOÃO PESSOA

2019

RENATA LIRA DE ASSIS

**AÇÕES DA ANGIOTENSINA-(1-7) NA REGENERAÇÃO CARDÍACA
DE RATOS**

Trabalho de conclusão de curso apresentado ao Centro de Biotecnologia da Universidade Federal da Paraíba, em cumprimento aos requisitos necessários para obtenção do título de Bacharel em Biotecnologia.

Orientador: Prof. Dr. Enéas Ricardo de Moraes Gomes

JOÃO PESSOA

2019

Catálogo na publicação
Seção de Catalogação e Classificação

A848a Assis, Renata Lira.

Ações da Angiotensina-(1-7) na Regeneração Cardíaca de Ratos / Renata Lira Assis. - João Pessoa, 2019.
48 f. : il.

Orientação: Enéas Ricardo de Moraes Gomes.
Monografia (Graduação) - UFPB/Biotecnologia.

1. Proliferação. 2. Angiotensina (1-7). 3. Coração. 4. Cardiomiócitos. I. Gomes, Enéas Ricardo de Moraes. II. Título.

UFPB/BC



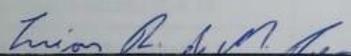
UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA (UFPB)
CENTRO DE BIOTECNOLOGIA (CBiotec)
CAMPUS I – JOÃO PESSOA/PB
Coordenação do Curso de Bacharelado em
Biotecnologia



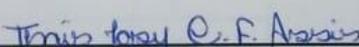
FOLHA DE AVALIAÇÃO DE TCC

ATA DE DEFESA PÚBLICA DO TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

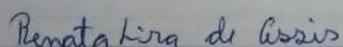
Aos vinte e seis dias do mês de abril de 2019, às 16:00h, em sessão pública no auditório do Instituto de Pesquisa em Fármacos e Medicamentos (IPeFarM) deste Campus Universitário, na presença da Banca Examinadora presidida pelo Professor Dr. Enéas Ricardo de Moraes Gomes e composta pelas avaliadoras: 1. Profa. Dra. Thaís Josy Castro Freire de Assis (DFST/CCS/UFPB); 2. Dra. Andrezza Miná Barbosa (NUPECC/UFPB), a discente Renata Lira de Assis, matrícula 11500995, apresentou o Trabalho de Conclusão de Curso intitulado: **“Ações da Angiotensina-(1-7) na regeneração cardíaca de ratos”**, como requisito curricular indispensável para a integralização do Curso de Graduação em Biotecnologia. Após reunião em sessão reservada, a Banca Examinadora deliberou e decidiu pela APROVAÇÃO do referido trabalho, divulgando o resultado formalmente ao discente e demais presentes e eu, Enéas Ricardo de Moraes Gomes, na qualidade de Presidente da Banca, lavrei a presente ata que será assinada por mim, pelos demais avaliadores e pelo discente.



Presidente da Banca Examinadora



Avaliador 1



Discente



Avaliador 2

João Pessoa/PB, 26 de abril de 2019.

*A Deus, aos meus pais Sandra e Roberto e
à minha irmã Raíssa, por todo amor, carinho
e força durante a elaboração deste trabalho.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a **Deus** por estar sempre comigo e me ajudar a não desistir de meus objetivos e a **Nossa Senhora** que com seu amor de mãe me protege todos os dias.

Sou muito grata também a toda minha **família**, por sempre me incentivarem nos estudos. Em especial minha mãe **Sandra**, minha irmã **Raíssa** e meu pai **Roberto** que foram as pessoas que me acompanharam e viram de perto todas as dificuldades e alegrias da minha vida até hoje. Minha mãe que sempre esteve ao meu lado me ouvindo, me entendendo, me ajudando e me amando diariamente; sendo uma verdadeira amiga que posso contar sempre. Minha irmã que é minha melhor amiga e companheira de todas as horas. E meu pai que sempre muito presente e compreensivo me ajudou muito durante minha vida.

Agradeço também a **Welson** que além de namorado é meu amigo e me ajudou muito com sua compreensão, paciência, companheirismo e amor.

Agradeço a **Chiara Lubich, Chiara Luce, Gabi e Vinícius** que lá no paraíso e com seus exemplos me ajudam a ser uma pessoa melhor a cada dia.

Ao **movimento dos Focolares** que com os ensinamentos sobre a unidade e a arte de amar, me fazem perceber que o mundo melhor e mais unido é possível. **A todos os e as Gen (Os Lindos e lindinhos)**. Em especial a minha unidade Gen 2 **Raios de luz** e às **Gen 3 menores** que me ajudam tanto.

Aos meus amigos da escola que mesmo um pouco distantes estão sempre comigo. Em especial, **Raissa, Marília, Isabella, Amanda e Wesley (Gaiola)**.

Aos meus amigos da universidade que diariamente me ajudaram nos estudos, trabalhos, provas, seminários, além da companhia para conversas, desabos e momentos de alegria e descontração. Em especial **Brena, Mickael, Bianca, Julyana, Patrik, Felipe, Wagner e João** que estiveram mais de perto me acompanhando em tudo.

Ao meu orientador **Prof. Dr. Enéas Gomes** que é um grande pesquisador e orientador. Sempre me apoiando e passando seu conhecimento deixando tudo mais simples para que eu aprendesse da melhor forma.

Ao **Laboratório de Biotecnologia Celular e Molecular** por todo apoio estrutural e a todos os participantes do mesmo (**Demétrius, T Cris, Itácio, Aliny, Renata, Aline, Matheus,**

Lucas, Ubiratan, Samuel, Bruna, Monalisa). Em especial **Andreza** por me ensinar muitas técnicas e me acompanhar nos experimentos com tanta atenção e dedicação. A **Fagner** e **Maria Luiza** que também me auxiliaram dando dicas sobre as técnicas e passando seus conhecimentos. E a **Joseanne, Yasmin** e **Nicolas** que foram meus companheiros de experimentos me ajudando em muitos momentos.

A **Prof^a. Dr^a. Patrícia Mirella** que me ensinou as técnicas histológicas com tanta atenção e paciência e a todo o Laboratório de Imunologia e Patologia de Invertebrados pela estrutura e ajuda com os experimentos, em especial a **Fernando, Romilda, Lucemberg, Raniele** e **Andrei**.

Aos amigos da minha irmã que se tornaram meus amigos também, em especial **Rayssa, Lucas** e **Nathalia** que sempre estiveram presentes.

Ao meu círculo do EJC **Larungidos**. Em especial **Isabelle, George, Raphael** e **Jordanna** por terem tanto carinho e atenção comigo e com todos os irmãos de círculo.

À **Universidade Federal da Paraíba (UFPB)** e ao **Centro de Biotecnologia (CBiotec)** pelo apoio e estrutura fornecidos. E ao **Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq)** pelo auxílio financeiro.

“Os jovens têm uma só vida e vale a pena vivê-la bem!”

Chiara Luce Badano

RESUMO

O Infarto agudo do miocárdio, uma das causas mais comuns de lesões no coração, provoca perda de cardiomiócitos. Assim, a proliferação dos cardiomiócitos apresenta-se como alternativa para repor as células perdidas. Com isso, o objetivo deste trabalho foi avaliar o potencial de proliferação de cardiomiócitos de ratos neonatais na presença da angiotensina-(1-7) [Ang-(1-7)]. A lesão do miocárdio em ratos neonatos foi induzida através da técnica da crioinjúria. Os animais foram separados em 4 grupos experimentais: I) animais que passaram pela crioinjúria e foram tratados com ang-(1-7) [crio+ang-(1-7)]; II) animais que sofreram a injúria, mas não tiveram tratamento (crio); III) animais controle tratados com ang-(1-7) [*sham*+ang-(1-7)] e IV) controle sem tratamento (*sham*). Após a indução da lesão, parte dos animais foi conduzida para a análise histológica dos corações e a outra foi tratada com a Ang-(1-7), através de administração subcutânea na dose de 30 µg/kg durante 35 dias. Para análise da função cardíaca dos animais tratados com Ang-(1-7) foi utilizada a técnica de ecocardiografia. Após esses procedimentos, foi feito o isolamento dos cardiomiócitos e as áreas das células foram medidas através de microscopia óptica. A partir da análise das lâminas histológicas foi possível visualizar a lesão cardíaca. Na análise ecocardiográfica, observou-se que a crioinjúria não provocou comprometimento da fração de ejeção significativamente. Embora tenha sido observada apenas uma tendência de redução da fração de ejeção, houve um aumento dos diâmetros diastólico em 16,29% e do sistólico em 41,77% dos animais crio comparados ao grupo *sham*. Adicionalmente, verificou-se que no grupo de animais Crio+Ang-(1-7), a fração de ejeção voltou aos valores controle com uma melhora de 38,43% dessa função, o diâmetro diastólico reduziu em 14,8% e o diâmetro sistólico teve redução de 25,91%. Além disso, ao analisar a área dos cardiomiócitos, foi observado que as áreas das células do grupo Crio+Ang-(1-7) foram significativamente maiores que os demais grupos com aumento de 16,83% em relação ao grupo crio e aumento de 13,79% em relação ao grupo controle. Diante disso, foi possível visualizar a injúria no coração dos animais, identificar que a Ang-(1-7) melhora a fração de ejeção nos animais infartados, conduz os diâmetros diastólico e sistólico para valores normais mesmo após uma lesão cardíaca e provoca inicialmente um aumento da área celular dos cardiomiócitos de ratos que sofreram a crioinjúria.

PALAVRAS-CHAVE: Proliferação. Angiotensina (1-7). Coração. Cardiomiócitos.

ABSTRACT

Acute myocardial infarction, one of the most common causes of heart damage, causes loss of cardiomyocytes. Thus, the proliferation of cardiomyocytes is an alternative to replace the lost cells. Therefore, the objective of this study was to evaluate the proliferation potential of cardiomyocytes from neonatal rats in the presence of angiotensin-(1-7) [Ang-(1-7)]. Myocardial injury in neonatal rats was induced by the cryoinjury technique. The animals were separated into 4 experimental groups: I) animals that underwent cryoinjury and were treated with ang-(1-7) [cryo + ang-(1-7)]; II) animals that suffered the injury, but did not have treatment (cryo); III) control animals treated with ang- (1-7) [sham + ang-(1-7)] and IV) control group without treatment (sham). After induction of the lesion, part of the animals was submitted to histological analysis of the hearts and the other was treated with Ang-(1-7), by subcutaneous administration at the dose of 30 µg/kg for 35 days. The echocardiographic technique was used to analyze the cardiac function of animals treated with Ang- (1-7). After these procedures, the cardiomyocytes were isolated and the cell areas were measured by light microscopy. From the analysis of the histological slides it was possible to visualize the cardiac lesion. In the echocardiographic analysis, it was observed that cryoinjury did not cause significant impairment of the ejection fraction. Although there was only a tendency to reduce ejection fraction, there was an increase in diastolic diameters in 16.29% and systolic in 41.77% of cryo animals compared to the sham group. Additionally, it was verified that in the group of animals Crio + Ang- (1-7), the ejection fraction returned to the control values with an improvement of 38.43% of this function, the diastolic diameter decreased by 14.8% and the systolic diameter had a reduction of 25.91%. In addition, when analyzing the area of the cardiomyocytes, it was observed that the areas of the cells of the group Crio + Ang- (1-7) were significantly higher than the other groups with a 16.83% increase in relation to the cryo group and increase of 13.79% in relation to the control group. Therefore, it was possible to visualize the injury in the animals' hearts, to identify that Ang- (1-7) improves the ejection fraction in infarcted animals, leads the diastolic and systolic diameters to normal values even after cardiac injury and initially causes an increase in the cell area of the cardiomyocytes of rats that suffered cryoinjury.

KEY WORDS: Proliferation. Angiotensin (1-7). Heart. Cardiomyocytes.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Principais causas globais de mortes no ano 2000.....	16
Figura 2 - Principais causas globais de mortes no ano de 2016. Erro! Indicador não definido.	
Figura 3 - Mortes por doenças cardiovasculares no Brasil.....	18
Figura 4 - Taxa de mortalidade no Brasil por doença cardiovascular (DCV) e distribuição por causas no ano de 2013.. ..	19
Figura 5 - Sistema Renina Angiotensina.. ..	23
Figura 6 - Vias de sinalização que convergem para o bloqueio da hipertrofia cardíaca.....	24
Figura 7 - Cirurgia de crioinjúria em ratos.	27
Figura 8 - Lâmina histológica pronta para coloração.	28
Figura 9 - Ecocardiografia – Análise em modo Monodimensional.....	311
Figura 10 - Isolamento de cardiomiócitos após tratamento com angiotensina (1-7).....	322
Figura 11 - Medição da área de cardiomiócitos por microscopia óptica.....	333
Figura 12 - Visualização microscópica de histologia de coração de rato com coloração HE.. ..	344
Figura 13 - Visualização microscópica de histologia de coração de rato com coloração TM.	355
Figura 14 - Fração de ejeção obtida das imagens no modo bidimensional da técnica de ecocardiografia.. ..	366
Figura 15 - Análise do Diâmetro Diastólico.....	367
Figura 16 - Análise do Diâmetro Sistólico.	377
Figura 17 - Área celular dos cardiomiócitos dos quatro grupos analisados por microscopia óptica.	Erro! Indicador não definido. 38

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AKT	Proteína cinase B
Ang I	Angiotensina I
Ang II	Angiotensina II
Ang-(1-7)	Angiotensina-(1-7)
AT1-R	Receptor AT1
B₂R	Receptor de bradicinina tipo 2
CaCl₂	Cloreto de cálcio
cGMP	Monofosfato de guanosina cíclico
DAC	Doença arterial coronariana
DCBV	Doenças cerebrovasculares
DCVs	Doenças cardiovasculares
DH	Doenças hipertensivas
DIC	Doenças isquêmicas do coração
ECA 2	Enzima Conversora de Angiotensina 2
ERK ½	Cinase regulada por sinal extracelular 1/2
ET-1	Endotelina
ET-R	Receptor de endotelina
FBS	Soro bovino fetal
FCF	Fator de crescimento de fibroblastos
GSK3β	Glicogênio sintase cinase 3β
ICC	Insuficiência cardíaca congestiva

KCl	Cloreto de potássio
Mas	Receptor Mas
MgCl₂	Cloreto de Magnésio
NaCl	Cloreto de sódio
NaH₂PO₄	Fosfato de sódio monobásico
NFAT	Fator nuclear de células T ativadas
NO	Óxido nítrico
NOS	Óxido nítrico sintase
NOS1	Óxido nítrico sintase 1
NOS3	Óxido nítrico sintase 3
NRG1	Neuregulina1
PFA	Paraformaldeído
PI3-K	Fosfatidil inositol-3 cinase
RPM	Rotações por minuto
Yap	Yes associated protein

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	15
2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....	16
2.1 DOENÇAS CARDIOVASCULARES.....	16
2.2 DOENÇA CORONARIANA	18
2.3 INFARTO DO MIOCÁRDIO	19
2.4 PROLIFERAÇÃO DE CARDIOMIÓCITOS	20
2.5 ANGIOTENSINA (1-7)	22
3 OBJETIVOS	Erro! Indicador não definido.
3.1 OBJETIVO GERAL.....	25
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	25
4 METODOLOGIA.....	26
4.1 LOCAIS PARA REALIZAÇÃO DOS EXPERIMENTOS	26
4.2 AUTORIZAÇÕES.....	26
4.3 ANIMAIS	26
4.4 INDUÇÃO DA LESÃO DO MIOCÁRDIO	26
4.5 HISTOLOGIA	27
4.5.1 Coloração Hematoxilina de Harris & Eosina (HE)	299
4.5.2 Coloração com Tricômio de Masson (TM).....	29
4.6 TRATAMENTO DOS ANIMAIS COM ANG-(1-7)	30
4.7 MEDIDA DA FUNÇÃO CARDÍACA	30
4.8 ISOLAMENTO DOS CARDIOMIÓCITOS VENTRICULARES.....	311
4.9 MEDIÇÃO DA ÁREA CELULAR DE CARDIOMIÓCITOS	32
4.10 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	333
5 RESULTADOS	344

5.1 ANÁLISES HISTOLÓGICAS.....	34
5.1.1 Análise qualitativa da lesão cardíaca com coloração HE	344
5.1.2 Análise qualitativa da lesão cardíaca com coloração TM.....	355
5.2 ANÁLISE DA FRAÇÃO DE EJEÇÃO POR MEIO DA ECOCARDIOGRAFIA	355
5.3 ANÁLISE DAS ÁREAS DOS CARDIOMIÓCITOS	388
6 DISCUSSÃO	399
7 CONCLUSÃO.....	422
REFERÊNCIAS.....	433

1 INTRODUÇÃO

As doenças cardiovasculares (DCVs) são as principais causas de mortes no mundo, afetando mais pessoas do que qualquer outra doença sendo, portanto, um problema de saúde pública (OMS, 2017).

No Brasil, essas doenças representam 30% do total de óbitos e o triplo de mortes quando comparadas com as doenças respiratórias (ROCHA, 2017; SBC, 2015a). E a primeira causa de mortes no Brasil é por infarto agudo do miocárdio (IAM), causando por ano 100 mil mortes (DATASUS, 2014).

O infarto agudo do miocárdio ocasiona mortes de cardiomiócitos devido a uma isquemia prolongada causada por obstrução de uma das artérias coronárias (DAVIES, 2000). Como os cardiomiócitos são células que param de se multiplicar nos primeiros anos de vida, o crescimento do coração causado pelo infarto ocorre devido a um remodelamento do coração ocasionado pela substituição do tecido com função contrátil por um tecido cicatricial sem função. Portanto, o músculo cardíaco induz um mecanismo compensatório hipertrófico que pode deixar o coração mais susceptível a arritmias, ataque cardíaco fulminante e insuficiência cardíaca, por exemplo (REBOUÇAS; SANTOS-MAGALHÃES; FORMIGA, 2016; SCORSIN; GUARITA-SOUZA, 2001).

Nos anos 90, não se tinha a ideia de regeneração ou reparo dessas células (RUMYANTSEV, 1977). O interesse pela regeneração do coração intensificou-se com um estudo mostrando a regeneração cardíaca de peixe-zebra adulto após induzida uma lesão cardíaca (POSS et al., 2002), essa regeneração ocorre por desdiferenciação limitada nos cardiomiócitos que estão em proliferação (JOPLING et al., 2010).

A partir de alguns estudos, foi notado que a Ang-(1-7) apresenta atividades cardioprotetoras como anti-hipertrofia, antiarritmia, antifibrose e anti-proliferação em fibroblastos. Seu receptor é o Mas e esse heptapeptídeo tem como alvo principalmente o coração e os vasos sanguíneos (CASTRO, 2008; SANTOS et al., 2003).

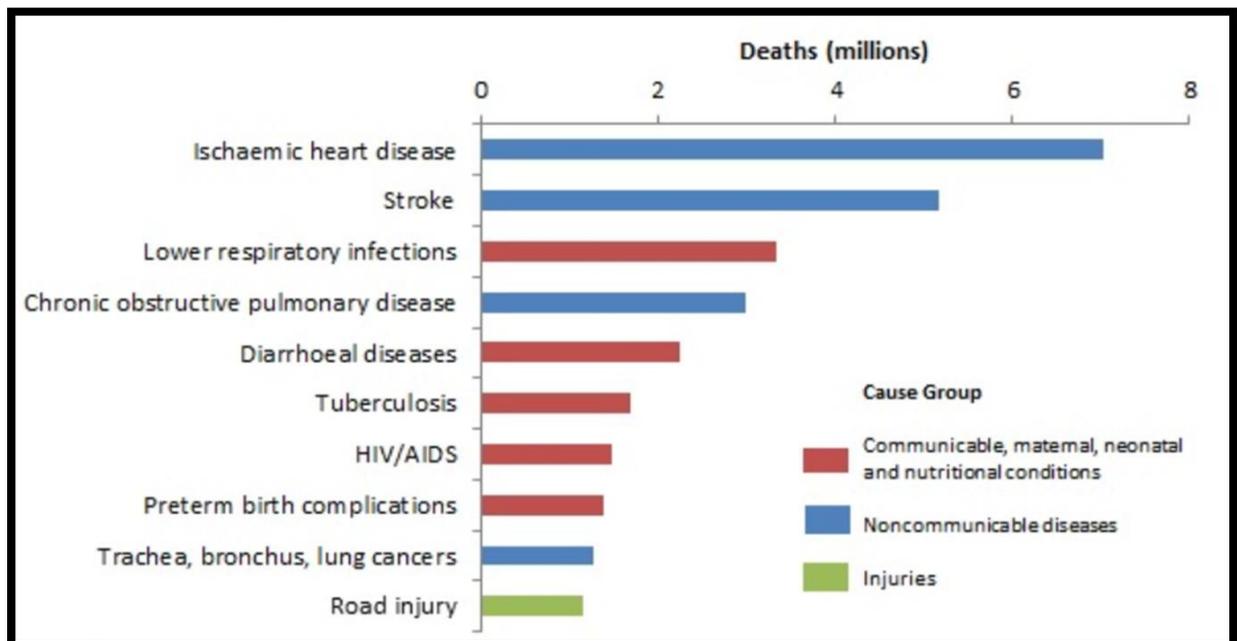
Estudos realizados por nosso grupo de pesquisa verificaram que a angiotensina-(1-7) [Ang-(1-7)] estimula uma via envolvida na proliferação de cardiomiócitos, a via da fosfatidil inositol-3 cinase (PI3-K). Diante disso, a hipótese do trabalho é que a Ang-(1-7) induz a proliferação de cardiomiócitos em ratos neonatos.

2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1 DOENÇAS CARDIOVASCULARES

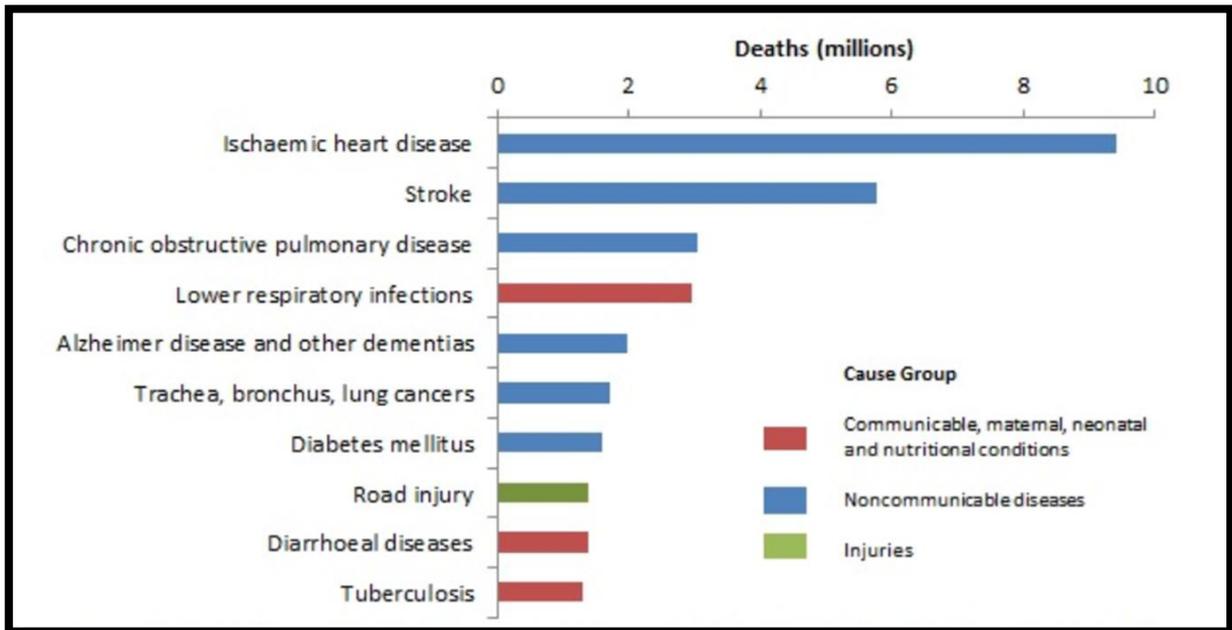
Em 2016, cerca de 17,9 milhões de pessoas morreram por DCVs, o que corresponde a 31% das mortes mundiais e 44% de todas as mortes por doenças não transmissíveis (WHO, 2017, 2018a). Esse número tem crescido ao longo dos anos e, além disso, verifica-se que dentre as dez doenças que mais causam mortes no mundo, as DCVs se mantiveram como as principais, podendo-se destacar a doença isquêmica do coração como a que mais ocasionou óbitos entre 2000 e 2016 (WHO, 2018b) (Figura 1 e Figura 2).

Figura 1 - Principais causas globais de mortes no ano 2000



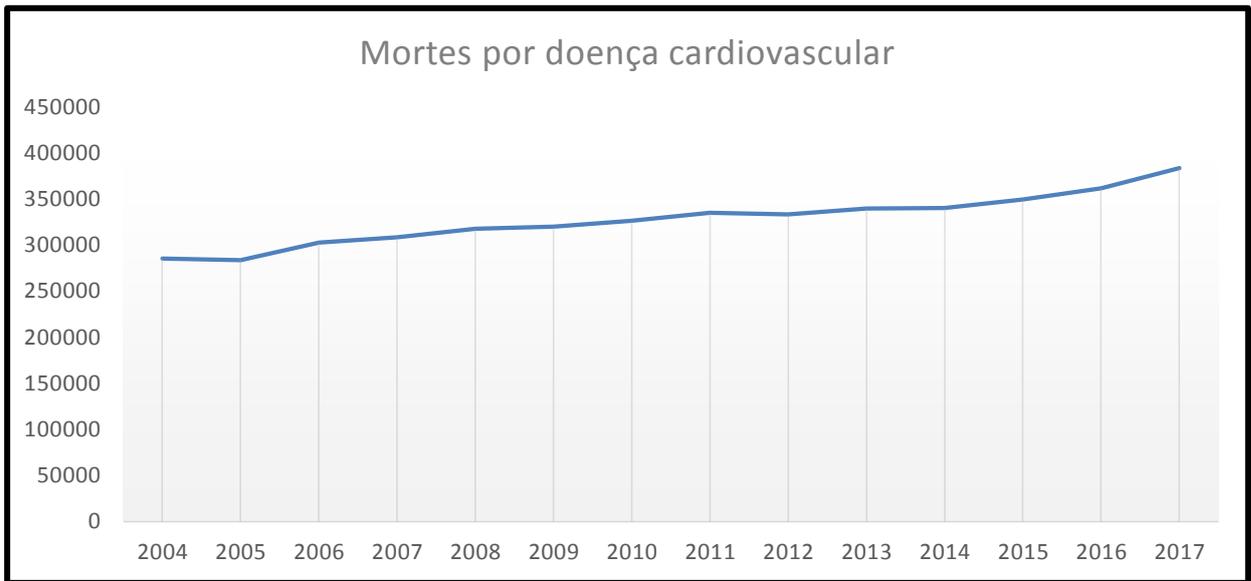
Fonte: WHO, 2018b.

Figura 2 - Principais causas globais de mortes no ano de 2016



Fonte: WHO, 2018b.

No Brasil, de acordo com a Sociedade Brasileira de Cardiologia (SBC) (2015a), cerca de 350 mil pessoas a cada ano morrem devido a DCVs. Segundo a SBC, há mais de mil mortes diariamente, cerca de 43 a cada hora e por volta de 1 morte a cada 1,5 minuto. Adicionalmente, essas doenças provocam 2,3 mais mortes do que todas as causas externas (acidentes e violência) e 6,5 vezes mais mortes do que as causadas por infecções como a Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (AIDS) (SOCIEDADE BRASILEIRA DE CARDIOLOGIA, 2015a). Além disso, de acordo com o cardiômetro, indicador do número de mortes por doenças cardiovasculares no Brasil e que é constantemente atualizado pela SBC, cerca de 114.217 pessoas já morreram devido a essas doenças até meados do mês de abril de 2019 no país (SOCIEDADE BRASILEIRA DE CARDIOLOGIA, 2015a). A SBC em 2017 teve uma estimativa de 383.961 mortes (Figura 3) e vem verificando que as mortes por doenças cardiovasculares vêm aumentando ao longo dos anos (SOCIEDADE BRASILEIRA DE CARDIOLOGIA, 2015b).

Figura 2 - Mortes por doenças cardiovasculares no Brasil

Fonte: Adaptado de Sociedade Brasileira de Cardiologia, 2015b.

2.2 DOENÇA CORONARIANA

As DCVs são definidas como doenças do coração e dos vasos sanguíneos. Dentre elas existe a doença arterial coronariana (DAC) que atinge os vasos sanguíneos responsáveis pela irrigação do músculo cardíaco (SBC, 2015b).

Essa doença atinge cerca de 7 milhões de pessoas (TORTORA; DERRICKSON, 2016), é a causa mais comum de mortes antes dos 75 anos na Europa (TOWNSEND et al., 2015) e a mesma provoca a cada ano por volta de 750.000 mortes nos Estados Unidos (TORTORA; DERRICKSON, 2016), tendo sido responsável por cerca de 1 em cada 7 mortes em 2011 (MOZAFFARIAN, et al., 2015) nesse país, e em 2015 correspondeu a 43,8% de mortes dentre as DCVs nesse local (BENJAMIN et al., 2018).

A DAC é a forma mais comum de doença cardíaca e ocorre quando há diminuição ou endurecimento das artérias que fornecem sangue ao coração por causa do acúmulo e crescimento de placas de aterosclerose (compostas por gordura, colesterol, tecido fibroso e outras substâncias encontradas no sangue) na parede dos vasos podendo dificultar ou impedir o fluxo sanguíneo (NEW YORK STATE, 2012; SOCERJ, 2013). Caso esse entupimento pela aterosclerose atinja 50% ou mais do diâmetro da artéria, não haverá fluxo de sangue suficiente para fornecer nutrientes para a região do coração irrigada pela artéria bloqueada,

principalmente em situações que há mais necessidade de oxigênio como no momento de um exercício físico (SOCERJ, 2013).

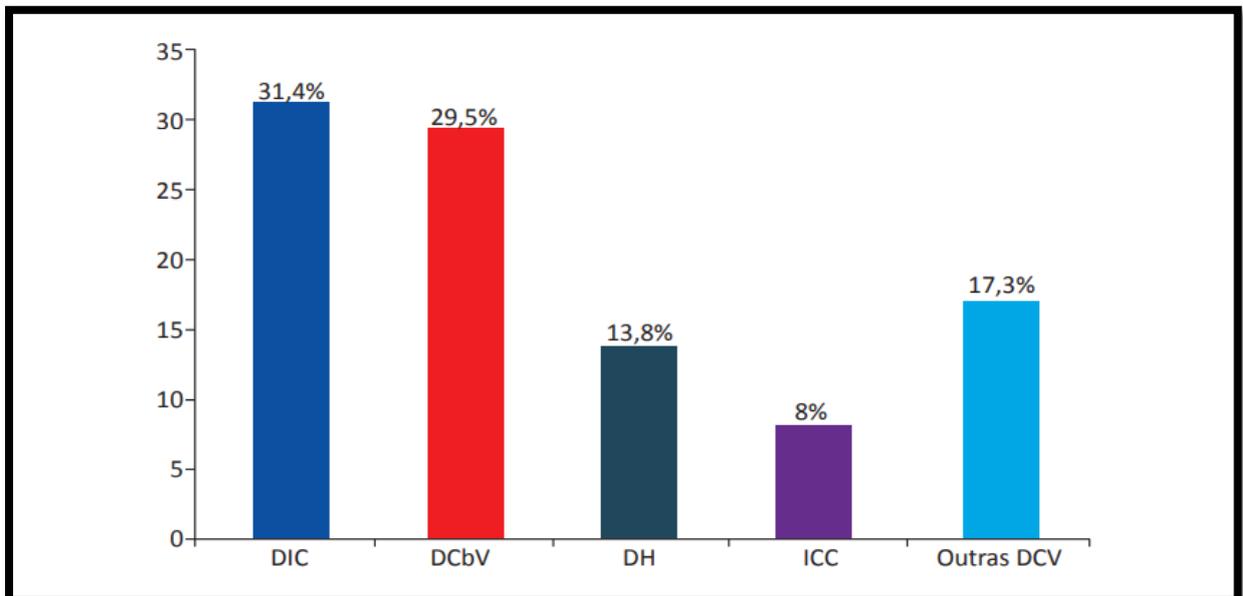
Esse fenômeno de irrigação insuficiente é conhecido como isquemia que se for prolongado pode levar à morte do tecido, que caracteriza o infarto. Se esse problema ocorrer no coração, ele é chamado de infarto do miocárdio (SOCERJ, 2013).

2.3 INFARTO DO MIOCÁRDIO

As maiores causadoras de mortes no mundo são a doença isquêmica do coração e o derrame, que foram responsáveis por 15,2 milhões de mortes em 2016. Além disso, nos últimos 15 anos, essas doenças permaneceram sendo as principais causas de mortes no mundo todo (WHO, 2018b).

As doenças isquêmicas do coração (DIC) são as principais responsáveis por mortes por DCVs, representando 31,4 % das mortes (Figura 4) e 30,8 % dos óbitos por DAC no Brasil, seguidas das doenças cerebrovasculares (DCbV) que representam 29,5% das mortes por DCVs e 30,0% por DAC no país (ROCHA, 2017).

Figura 4 - Taxa de mortalidade no Brasil por doença cardiovascular (DCV) e distribuição por causas no ano de 2013



Legenda: DIC: Doenças isquêmicas do coração; DCbV: Doença cerebrovascular; DH: doenças hipertensivas; ICC: insuficiência cardíaca congestiva; DCV: doenças cardiovasculares. **Fonte:** ROCHA, 2017.

O Infarto do Miocárdio (IM) esteve inserido como o segundo grupo de causas com maior número de óbitos no Brasil entre os anos de 2004 e 2014 (SBC, 2015b). É definido como sendo a obstrução completa do fluxo sanguíneo em uma artéria coronária, ocasionando o infarto (morte de uma área de tecido induzida pela interrupção da irrigação sanguínea) (TORTORA; DERRICKSON, 2016). Quando o tecido cardíaco distal morre devido a uma obstrução o mesmo é substituído por tecido cicatricial que não é contrátil, diminuindo, portanto, sua força de contração (TORTORA; DERRICKSON, 2016).

Um infarto pode realizar alterações no complexo estimulante do coração e ocasionar morte súbita, dependendo da extensão e da localização da área infartada. No entanto, se o músculo cardíaco receber ao menos 10 a 15% de sua irrigação sanguínea normal, ele se mantém vivo em uma pessoa em repouso (TORTORA.; DERRICKSON; 2016).

Quando ocorre o infarto agudo do miocárdio, a disfunção dos ventrículos é ocasionada principalmente pela perda de cardiomiócitos, prejudicando a fração de ejeção (TUCCI, P. J. F., 2011). Com um acidente isquêmico que culmina na morte de cardiomiócitos adultos, há uma fibrose do músculo cardíaco que pode conduzir à insuficiência cardíaca. Isso porque os cardiomiócitos adultos não conseguem se multiplicar naturalmente (SOUZA et al., 2002).

2.4 PROLIFERAÇÃO DE CARDIOMIÓCITOS

Os cardiomiócitos por serem células vitais para o coração, a perda e a regeneração insuficiente das mesmas contribuem para a patogênese de muitas doenças cardiovasculares (PONNUSAMY; LI; WANG, 2017).

Acreditava-se que os cardiomiócitos de adultos mamíferos eram células pós-mitóticas, retirando-se do ciclo celular de maneira irreversível e passando a crescerem apenas por hipertrofia. Dessa forma, após a perda de cardiomiócitos, o coração seria incapaz de gerar novas células (FERNANDES; PERIN, 2007; YUTZEY, 2017). A partir de alguns experimentos o paradigma de que o coração adulto é um órgão terminalmente diferenciado tem sido alterado (BERGMANN et al., 2009).

A falta de reposição de cardiomiócitos induz um remodelamento do tecido cardíaco em adultos, já nos tecido miocárdico neonatal e fetal não há muitos prejuízos devido à proliferação de cardiomiócitos pré-existentes, mantendo, portanto, seu tecido contrátil. Com isso, alguns estudos enfatizam a capacidade de reentrada dos cardiomiócitos no ciclo celular estimulando algumas vias de sinalização (PONNUSAMY; LI; WANG, 2017).

Estudos realizados por Poss, Wilson e Keating (2002) demonstraram, que há completa regeneração do coração no peixe-zebra, sem formação de cicatriz, após 2 meses de uma ressecção cardíaca em que se retirou 20% do órgão. Em os corações de camundongos neonatos, após cirurgia de ressecção cardíaca com 1 dia de vida, foi observado que eles possuíam a capacidade de regeneração até 7 dias de idade (PORRELLO et al., 2011). Essa regeneração do órgão foi atribuída à desdiferenciação e proliferação generalizada dos cardiomiócitos com reduzida hipertrofia ou fibrose. Adicionalmente, foi verificado que os novos cardiomiócitos componentes do tecido regenerado eram originados de cardiomiócitos preexistentes (PORRELLO et al., 2011).

Outros estudos demonstram que o coração de mamíferos possui uma capacidade regenerativa do coração fetal que pode compensar uma perda efetiva de 50% do tecido cardíaco ao haver a proliferação de células cardíacas saudáveis remanescentes, tendo como resultado um coração totalmente funcional (DRENCKHAHN et al., 2008).

Para induzir a proliferação dessas células durante o desenvolvimento do organismo, algumas estratégias já foram estudadas. Uma delas é a utilização da periostina que estimula a entrada de cardiomiócitos mononucleados no ciclo celular por meio da ativação da fosfatidil inositol-3-OH quinase (PI3-K) (KÜHN et al., 2007).

Nos estudos sobre a periostina, foi notado que com a reentrada dos cardiomiócitos no ciclo celular observou-se um melhor remodelamento ventricular, melhor função do miocárdio e fibrose e tamanho de infarto reduzidos, além de um aumento da angiogênese (KÜHN et al., 2007). Além disso, foi verificado que a via da PI3-K é suficiente para a reentrada das células cardíacas no ciclo celular mesmo na ausência de periostina (KÜHN et al., 2007).

Adicionalmente, o fator de crescimento de fibroblastos (FCF) também ativa a proliferação através da PI3-K e essa reentrada das células no ciclo celular por estímulo do FCF ainda é potencializada pela inibição da proteína quinase ativada por mitógeno p38 (MAP quinase p38) (ENGEL et al., 2005).

Adicionalmente, foi observado que fatores extracelulares diferentes induzem a proliferação de cardiomiócitos através da ativação de vias que convergem na PI3-K (BERSELL et al., 2009). Outro exemplo disso é a proliferação de cardiomiócitos diferenciados *in vitro* por meio da neuregulina1 (NRG1) que é um fator de crescimento com o ErbB4 como seu receptor de tirosina quinase (BERSELL et al., 2009).

A neuregulina1 induz apenas a divisão dos cardiomiócitos mononucleados e nos estudos com esse fator de crescimento houve a regeneração do miocárdio que resultou na melhora da função cardíaca após o infarto do miocárdio (BERSELL et al., 2009). A partir dos

experimentos, foi verificado que a atuação da neuregulina1 na indução da proliferação dos cardiomiócitos é dependente de PI3-K (BERSELL et al., 2009).

Além disso, a via de sinalização Hippo é um repressor endógeno da renovação e regeneração de cardiomiócitos adultos por inibir a proliferação celular (HEALLEN et al., 2013). Com isso, a inibição da via de sinalização Hippo pela proteína Yap é outra estratégia que promove a regeneração cardíaca e melhora a contratilidade após o infarto do miocárdio através da indução a proliferação de cardiomiócitos embrionários ao ativar o fator de crescimento semelhante à insulina que ativa a PI3-K e a Akt (DORN; FORCE, 2005; ZHOU, et al., 2015; XIN et al., 2013).

A PI3-K quando estimulada induz a reentrada dos cardiomiócitos no ciclo celular e a Akt quando ativada confere proteção contra a morte celular provocada por isquemia e disfunção cardíaca (DORN; FORCE, 2005; KÜHN et al., 2007).

Adicionalmente, a Yap também ativa as vias de sinalização de Wnt que promove a proliferação de progenitores cardíacos (COHEN; TIAN; MORRISEY, 2008; XIN et al., 2011). Essa atividade regenerativa da Yap relaciona-se com a ativação de programas genéticos embrionários e proliferativos em células cardíacas (XIN et al., 2013).

A partir dessas evidências, verifica-se que a via de sinalização Hippo-yap pode contribuir para o reparo das células cardíacas após a indução de uma lesão cardíaca (XIN et al., 2013).

2.5 ANGIOTENSINA (1-7)

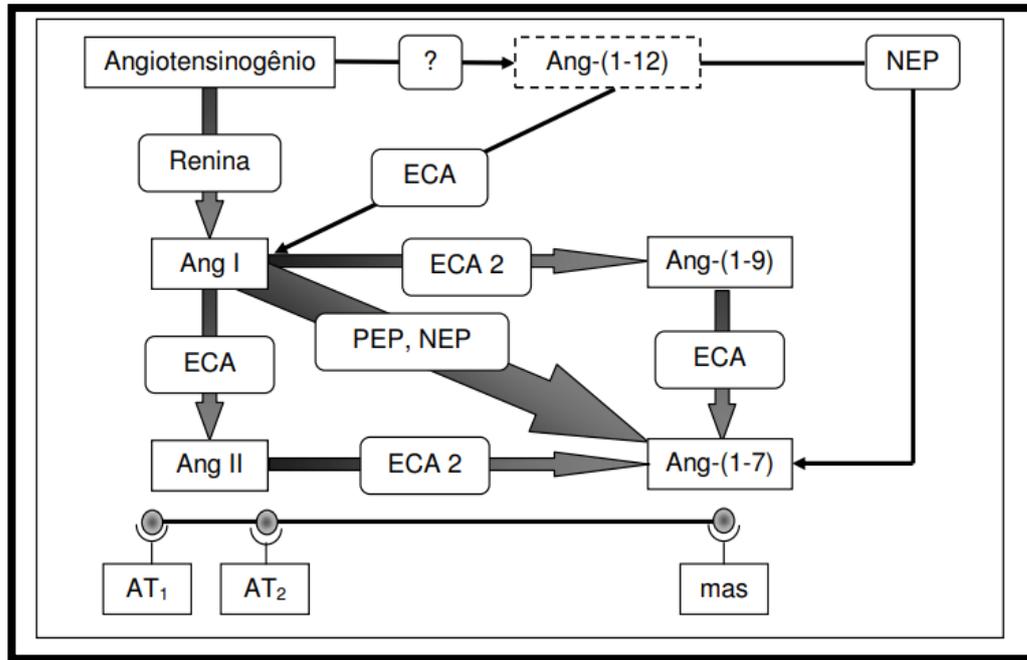
O sistema renina-angiotensina (SRA) é um sistema hormonal que tem o papel essencial relacionado ao controle da pressão arterial e homeostasia hidroeletrolítica do corpo. A Angiotensina II (Ang II) é conhecida classicamente como a principal substância ativa desse sistema promovendo a maior parte dos efeitos fisiológicos (DE OLIVEIRA; ALVES; BARAUNA, 2003; MENARD, 1993).

No entanto, essa visão tem sido mudada ao longo dos anos, pois se sabe que a multiplicidade de funções do sistema ocorre devido também às ações parácrina e autócrina tanto da Ang II como também de outros elementos produzidos pelo sistema (DE OLIVEIRA; ALVES; BARAUNA, 2003).

Outra substância importante desse sistema é a Ang-(1-7) que tem um papel cardioprotetor, antiarrítmico e melhora a contratilidade, além disso, melhora a função miocárdica (tensão sistólica) na isquemia/reperfusão (BENTER et al., 2006; FERREIRA;

SANTOS; ALMEIDA, 2001, 2002). Ela pode ser produzida pela enzima conversora de Angiotensina 2 (ECA 2) ao utilizar como precursor a Ang II (Figura 5). Além disso, a Ang-(1-7) é um heptapeptídeo que pode ser produzido também a partir da Angiotensina I (Ang I) através de outras endopeptidases (FERRARIO et al., 1997).

Figura 3 - Sistema Renina Angiotensina



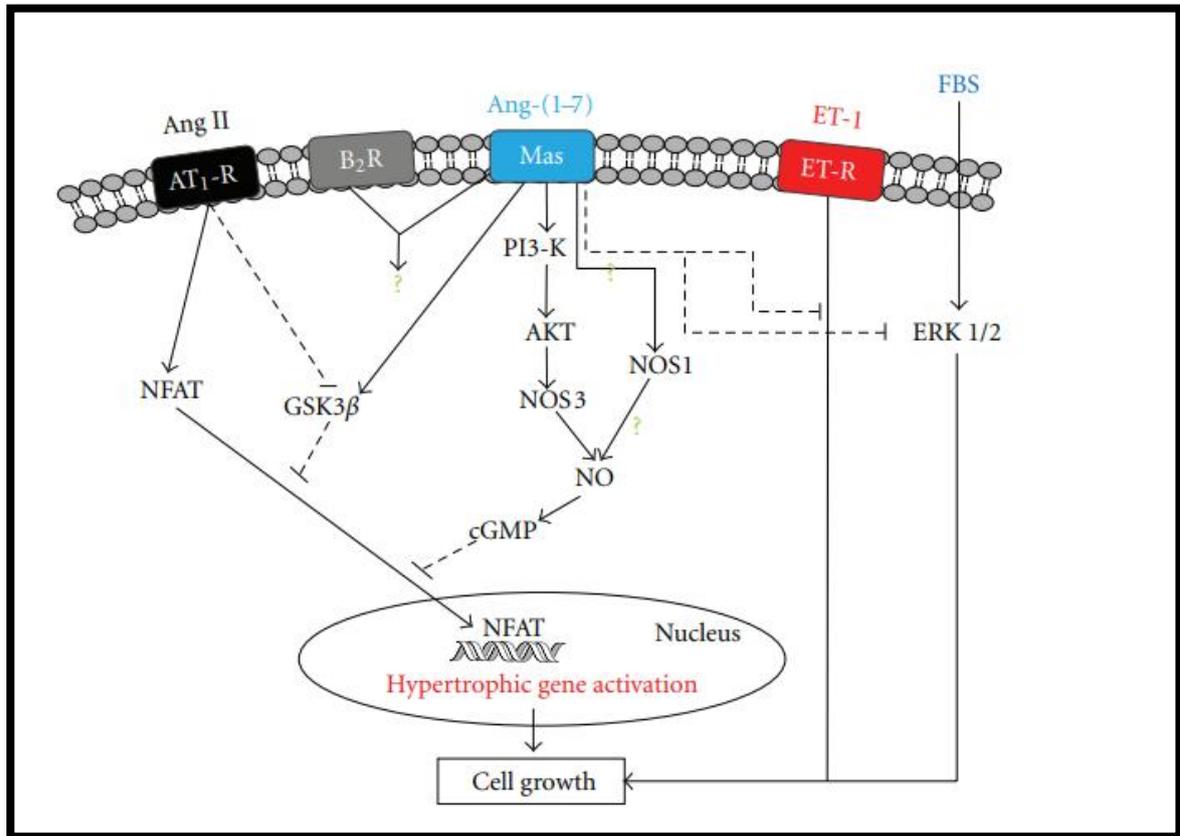
Legenda: ECA: enzima conversora de angiotensina; NEP: endopeptidase neutra; PEP – Prolilendopeptidase.
Fonte: Adaptado de JESSUP et al., 2008.

A Ang-(1-7) age em seu receptor Mas que é um receptor acoplado à proteína G (SANTOS et al., 2003). Quando esse peptídeo atua em seu receptor, há ativação da via PI3K/Akt que promove a ativação das NOS 1 e NOS 3, com isso, há produção de óxido nítrico (NO) nos cardiomiócitos (DIAS-PEIXOTO et al., 2008; SAMPAIO et al., 2007). Com o aumento de NO há estimulação da guanosina monofosfato cíclica (cGMP) que atua bloqueando a via hipertrófica por meio da inibição da translocação de NFAT induzida por Ang II (Figura 6) (GOMES; SANTOS; GUATIMOSIM, 2012).

Além dessa, outras vias de atuação da Ang-(1-7) para inibição do crescimento celular são pela endotelina (ET-1) e pelo soro bovino fetal (FBS). Essas vias culminariam no crescimento celular, no entanto a Ang-(1-7) bloqueia essas vias impedindo com isso o crescimento da célula (GOMES; SANTOS; GUATIMOSIM, 2012).

Com isso, o NO é importante para a regulação da função miocárdica no coração normal, sobrecarregado e no órgão infartado (UMAR; VAN DER LAARSE, 2010). Baseado nisso, verifica-se que a Ang-(1-7) atuando no receptor Mas pode ser uma possibilidade de tratamento de doenças cardiovasculares (SANTOS et al., 2003).

Figura 4 - Vias de sinalização que convergem para o bloqueio da hipertrofia cardíaca



Legenda: ET-1: endotelina; Ang II: angiotensina II; Ang- (1-7): angiotensina- (1-7); ET-R: receptor de endotelina; AT1-R: receptor AT1; Mas: Receptor Mas; B₂R: receptor de bradicinina tipo 2; FBS: soro bovino fetal; NFAT: fator nuclear de células T ativadas; GSK3 β : glicogênio sintase cinase 3 β ; PI3-K: fosfatidil inositol 3-cinase; AKT: proteína cinase B; NOS3: óxido nítrico sintase 3; NOS1: óxido nítrico sintase 1; NO: óxido nítrico; cGMP: monofosfato de guanosina cíclico; ERK 1/2: cinase regulada por sinal extracelular 1/2. Os pontos de interrogação correspondem às áreas em que o estado atual do conhecimento ainda não é totalmente descrito.
Fonte: GOMES, SANTOS, GUATIMOSIM, 2012.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar ações da angiotensina-(1-7) na regeneração cardíaca de ratos.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Analisar de forma qualitativa a lesão cardíaca;
- Analisar os efeitos da angiotensina-(1-7) na função cardíaca de animais com lesão cardíaca;
- Analisar os efeitos da angiotensina-(1-7) na área celular de cardiomiócitos provenientes de animais com lesão cardíaca.

4 METODOLOGIA

4.1 LOCAIS PARA REALIZAÇÃO DOS EXPERIMENTOS

Os procedimentos de preparação das lâminas histológicas foram realizados no Laboratório Multiusuário do Departamento de Biologia Molecular e no Laboratório de Imunologia e Patologia de Invertebrados e os demais experimentos foram feitos no Laboratório de Biotecnologia Molecular e Celular, ambos da Universidade Federal da Paraíba.

4.2 AUTORIZAÇÕES

Este trabalho foi aprovado pelo Departamento de Biotecnologia e pela comissão de ética no uso de animais do Centro de Biotecnologia (CBiotec) da Universidade Federal da Paraíba (UFPB), sob o protocolo CEUA nº 0204/13.

4.3 ANIMAIS

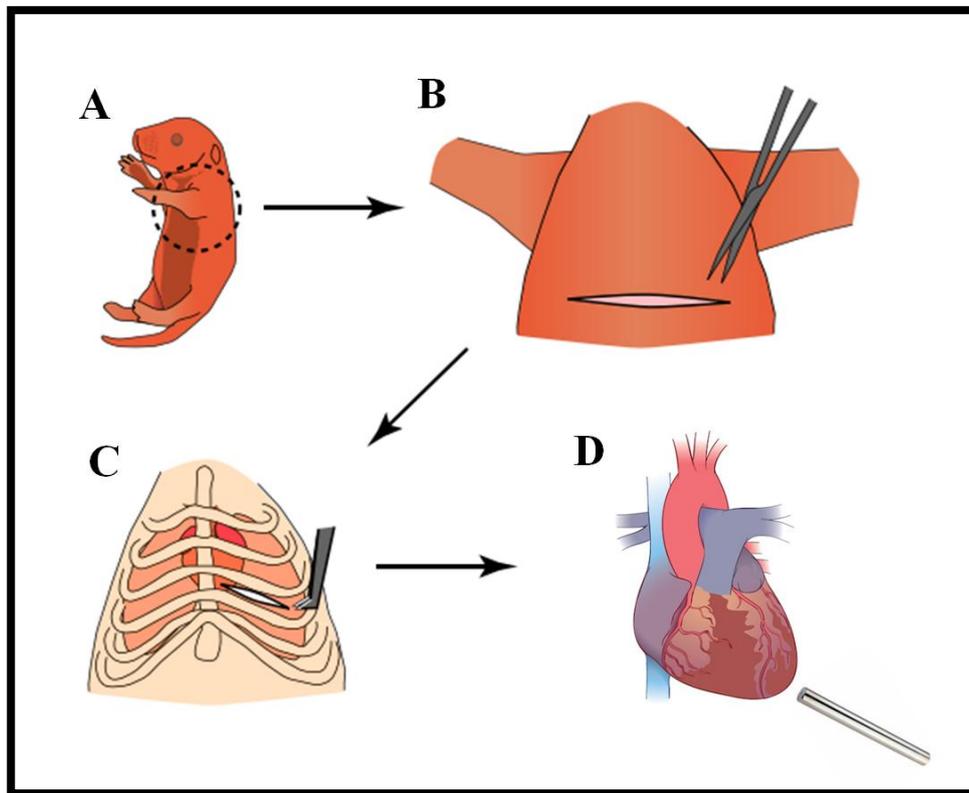
Para os experimentos, foram utilizados ratos *Wistar* neonatos de um a sete dias de vida, provenientes do biotério prof. Thomas George (CBiotec – UFPB). Os animais foram separados em quatro grupos experimentais: animais que passaram pela crioinjúria e foram tratados com ang-(1-7) [crio+ang-(1-7)]; animais que sofreram a injúria, mas não receberam tratamento com ang-(1-7) (crio); animais controle tratados com ang-(1-7) [*sham*+ang-(1-7)] e controle sem tratamento com ang-(1-7) (*sham*).

4.4 INDUÇÃO DA LESÃO DO MIOCÁRDIO

Para indução da lesão do miocárdio, foi utilizada a técnica de crioinjúria. Inicialmente, após hibernação em gelo e higienização do neonato com álcool etílico 70% e álcool iodado principalmente na região da pele próxima à região que será realizada a incisão (Figura 7A), o animal foi imobilizado em decúbio dorsal usando uma fita crepe. Em seguida, foi feita uma toracotomia esquerda (Figura 7B) entre a 3ª e 4ª costelas, de maneira que os músculos intercostais foram separados (Figura 7C). Depois, foi realizada a exposição do coração e foi feita uma lesão no ápice do ventrículo esquerdo durante 5 segundos utilizando para isso uma haste metálica que estava previamente mergulhada em nitrogênio líquido (Figura 7D). Após a realização da injúria, o coração foi recolocado na caixa torácica e foi realizada a sutura de

musculatura, costelas e pele. Por fim, os animais foram levados para recuperação em condições normais.

Figura 5 - Cirurgia de crioinjúria em ratos



Legenda: (A) Hibernação em gelo, higienização e localização das costelas do animal, (B) Toracotomia esquerda, (C) Afastamento das costelas, (D) Crioinjúria por meio do contato de uma haste metálica previamente resfriada em nitrogênio líquido no ápice do coração. **Fonte:** Adaptado de MAHMOUD et al., 2014.

4.5 HISTOLOGIA

A confirmação da presença de lesão no coração foi realizada através da análise histológica do tecido cardíaco. Para isso, após a realização da cirurgia de crioinjúria nos ratos neonatos de 7 dias de vida e posterior recuperação dos mesmos durante 3 horas em condições normais, os animais foram eutanasiados e seus corações foram colocados em cassetes imersos em formalina a 10% em uma relação de 1:10 (amostra:formalina). Em seguida, foram armazenados a 4°C.

Depois de um período de 48 horas, a formalina foi retirada do recipiente que continha as amostras e as mesmas foram lavadas em água corrente por 10 minutos. Em seguida, foi

colocado no recipiente álcool etílico 70% em uma quantidade de 1:10 (amostra : álcool etílico 70%) e elas foram armazenadas a 4°C.

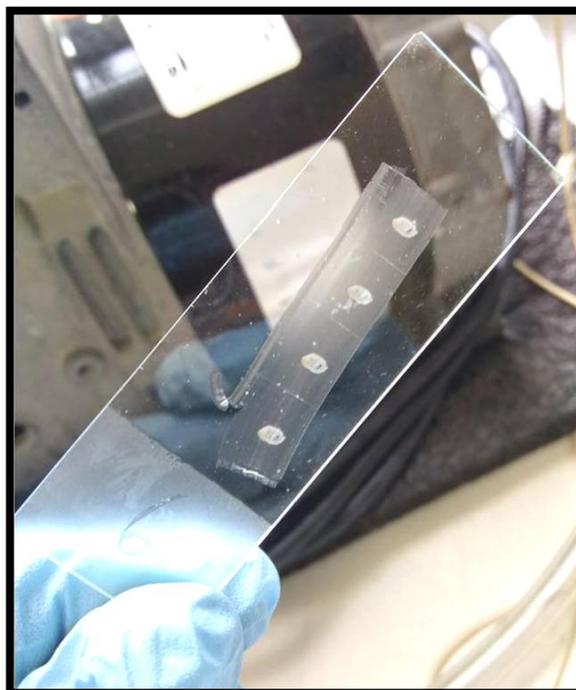
Após cinco dias, foi realizado o processamento automático do material que permaneceu em álcool etílico 80% por uma hora, em seguida houve três passagens de uma hora em álcool etílico 96%, depois três passagens de uma hora em álcool etílico P.A., em seguida uma hora em solução contendo 50% álcool etílico P.A. e 50% xilol P.A., depois duas passagens em xilol P.A. por uma hora e por fim duas passagens de uma hora em parafina histológica.

No dia seguinte, o material foi retirado do processador de tecidos e foi realizada também a inclusão dos corações em parafina histológica formando um bloco com o cassete.

Depois de dois dias, foram feitos cortes no micrótomo com uma espessura de 5µm para posterior confecção das lâminas. Cada corte foi colocado em água destilada em um banho maria a aproximadamente 44°C, para que as amostras ficassem uniformes e sem dobras. Em seguida, os cortes foram acomodados em uma lâmina de vidro e colocados para secar.

Após 1 dia, as amostras foram levadas para uma estufa onde permaneceram por 2 horas a 50°C para que os cortes fixassem melhor na lâmina e não soltassem durante a coloração (Figura 8).

Figura 6 - Lâmina histológica pronta para coloração



Fonte: Presente trabalho.

4.5.1 Coloração Hematoxilina de Harris & Eosina (HE)

Em seguida, foram selecionadas algumas lâminas para realizar a coloração pelo método convencional Hematoxilina de Harris & Eosina (H&E). Para isso, foi feita, 1 imersão por 5 minutos em xilol P.A., 6 imersões em xilol P.A. novamente, 2 passagens de 6 imersões em álcool etílico P.A., 6 imersões em álcool etílico 96%, 6 imersões em álcool etílico 70%, 6 imersões em álcool etílico 50%, 1 imersão em água destilada durante 2 minutos, 1 imersão em Hematoxilina de Mayer, novamente 1 imersão em água destilada por 2 minutos, 1 imersão em álcool etílico 70% por 3 minutos, 1 imersão em eosina durante 1 minuto e 30 segundos, 2 passagens com 6 imersões em álcool etílico 96%, 2 passagens com 6 imersões em álcool etílico P.A. e por fim 1 imersão em xilol P.A. por 3 minutos. Quando os cortes ficaram secos foi realizada a montagem das lâminas com uma lamínula e com entellan como meio para montagem.

Com isso, por a Hematoxilina ser um corante básico, ela cora componentes ácidos das células, sendo responsável principalmente pela coloração azul escuro do núcleo, já a Eosina é um corante ácido que cora as estruturas básicas da célula em rosa, destacando bem o citoplasma da célula.

4.5.2 Coloração com Tricômio de Masson (TM)

Para essa coloração, foram seguidas as instruções de acordo com o protocolo especificado pelo fabricante WCor Corantes como especificado a seguir.

Inicialmente, foi realizada a desparafinização com xilol P.A. por 5 minutos. Em seguida, foram feitas 6 imersões em xilol P.A., depois 2 passagens de 6 imersões em álcool etílico P.A., 6 imersões em álcool etílico 96%, 6 imersões em álcool etílico 70%, 6 imersões em álcool etílico 50% e 1 imersão em água destilada. Em seguida, os cortes foram cobertos com o reagente A que contém Alumen de ferro por 5 minutos, depois foram lavados suavemente com água destilada, em seguida, foram cobertos com o reagente B composto por Hematoxilina por 3 minutos, sem lavar a lâmina foi colocado o reagente C que tem álcool etílico por 15 minutos e depois as lâminas foram lavadas com água destilada para posterior cobertura com o reagente D que possui uma solução diferenciadora que agiu por 5 minutos. Em seguida, a lâmina foi lavada com água corrente por 5 minutos e depois disso, os cortes foram cobertos com gotas do reagente E composto por fucsina durante 5 minutos para a

posterior lavagem com água destilada. Depois, foi utilizado o reagente F que contém ácido fosfomolibdico por 5 minutos e sem lavar os cortes foram cobertos com o reagente G composto por azul de anilina durante 5 minutos. Após passar por esses reagentes contidos no kit, a lâmina foi lavada mais uma vez com água destilada e a mesma passou por mais uma série de alcoóis em que primeiro, foram realizadas 2 passagens com 6 imersões em álcool etílico 96%, depois 2 passagens com 6 imersões em álcool etílico P.A. e por fim 1 imersão em xilol P.A. por três minutos.

Dessa forma, o tecido hialino é corado de vermelho, os núcleos ficam negros, o citoplasma adquire vários tons de vermelho, as fibras colágenas se apresentam em azul intenso e as mucinas em azul claro.

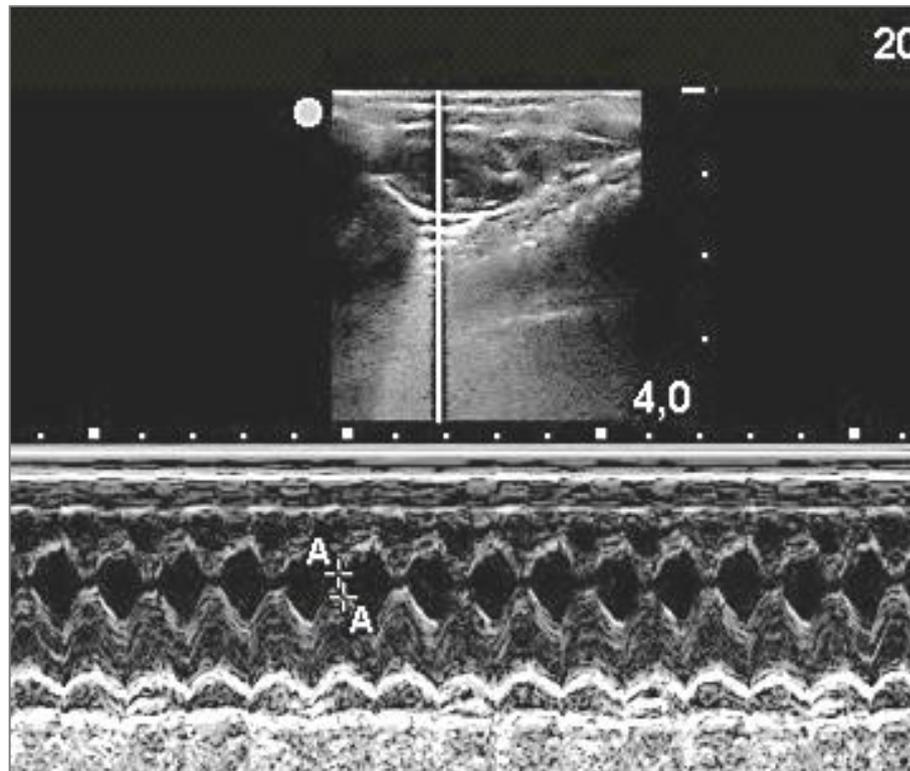
4.6 TRATAMENTO DOS ANIMAIS COM ANG-(1-7)

Após induzida a lesão, foi iniciado o tratamento com a Ang-(1-7) por 35 dias. Os animais foram tratados diariamente, via injeções subcutâneas na dose de 30µg/kg. Já os animais controle receberam injeções subcutâneas de solução salina a 0,9% de NaCl (1 mL/kg/dia) durante 35 dias.

4.7 MEDIDA DA FUNÇÃO CARDÍACA

Para analisar a função cardíaca, os animais foram anestesiados com cetamina (75 mg/kg) associada com xilazina (15 mg/Kg) administrados intraperitonealmente. Em seguida, foi realizada a tricotomia da porção esquerda do tórax dos ratos, e passaram pela avaliação Ecocardiográfica, onde foram avaliadas, nos modos mono (M) e bidimensional (bi), as variáveis: diâmetro diastólico, diâmetro sistólico e fração de ejeção. Para realização do exame, os animais foram posicionados em decúbito dorsal e foi utilizado o equipamento modelo SonoSite M-Turbo. Para avaliar as medidas estruturais do coração foram obtidas imagens em modo monodimensional (modo-M) orientado pelas imagens em modo bidimensional, estando o transdutor em posição para-esternal eixo menor. A avaliação do ventrículo esquerdo (VE) foi realizada posicionando o cursor do modo-M (Figura 9) logo abaixo do plano da valva mitral no nível dos músculos papilares (SIMONE et al., 1992; PLANA et al., 2014). A função sistólica do VE foi avaliada pela porcentagem de encurtamento sistólico $[(\text{diâmetro diastólico} - \text{diâmetro sistólico}) / \text{diâmetro diastólico}]$.

Figura 7 - Ecocardiografia – Análise em modo Monodimensional



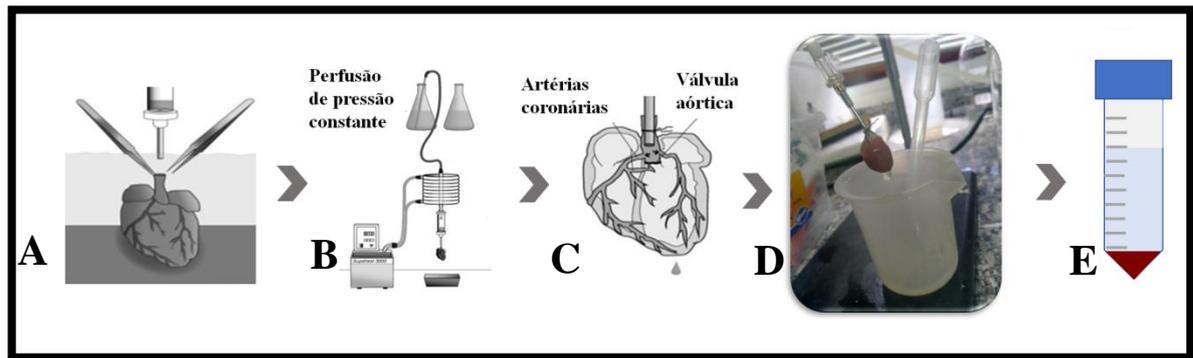
Fonte: Gentilmente cedida pelo Prof. Dr. Enéas Ricardo de Moraes Gomes.

4.8 ISOLAMENTO DOS CARDIOMIÓCITOS VENTRICULARES

Após esses procedimentos, com os animais já na fase adulta e pesando entre 92-130g foi feito o isolamento dos cardiomiócitos pelo método de perfusão retrógrada pela artéria aorta (Langendorff). Para isso foram utilizados 3 tubos com em diferentes componentes. O tubo 1 continha solução de digestão (SD) (NaCl 130 mM; KCl 5,4mM; Hepes 25,0 mM; MgCl₂ 0,5 mM; NaH₂PO₄ 0,33 mM; glicose 22,0 mM e insulina 10 µL/L), CaCl₂ e colagenase e os tubos 2 e 3 continha SD e CaCl₂.

Após a retirada do coração, banhados com SD, o órgão e a aorta foram limpos retirando-se coágulos e estruturas não importantes para o isolamento. Em seguida, o coração foi canulado em uma seringa pela artéria aorta (Figura 10A) e foi colocado em um sistema de perfusão (Figura 10B) com a solução do tubo 1 recirculando no sistema. Após 1 minuto, houve adição de colagenase para que os cardiomiócitos fossem liberados (Figura 10C e Figura 10D).

Figura 8 - Isolamento de cardiomiócitos após tratamento com angiotensina (1-7)



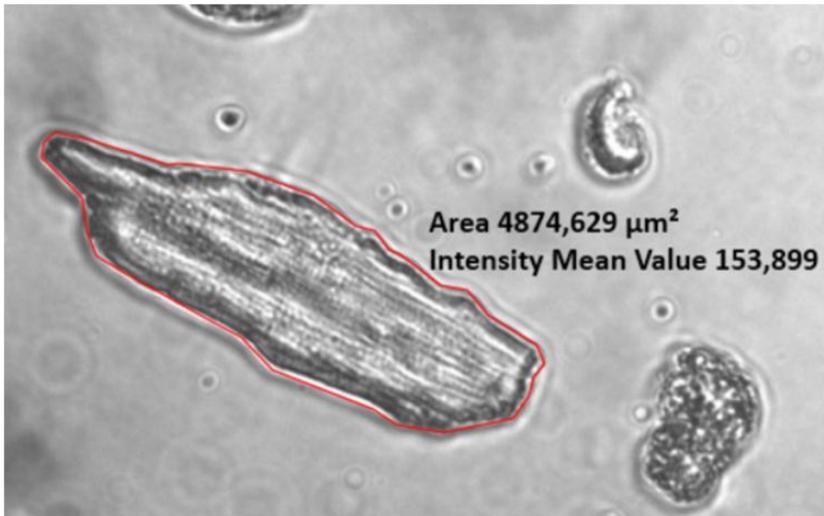
Legenda: (A) Canulação pela artéria aorta, (B) Sistema de perfusão, (C) e (D) Solução de digestão enzimática passando pelos vasos do coração, (E) Purificação dos cardiomiócitos através de centrifugações. Fonte: Adaptado de LOUCH, SHEEHAN, WOLSKA, 2011.

Em seguida, após 15 minutos as câmaras ventriculares foram removidas e picotadas e transferidas para o tubo 2 para a realização da digestão mecânica em banho a 37°C com o uso de uma pipeta de transferência. Depois, foi realizada a filtração e após a obtenção do filtrado, o mesmo passou pela primeira centrifugação durante 1 min a 100 rpm em temperatura ambiente para purificação dos cardiomiócitos. Após o descarte do sobrenadante, o pellet de células foi ressuscitado com a solução do tubo 3 na qual permaneceu sem agitação por 4 minutos. Depois, foi feita a segunda centrifugação nas mesmas condições da primeira, o sobrenadante foi descartado e as células foram ressuscitadas com paraformaldeído (PFA) 4% para fixação das células. Depois, os cardiomiócitos foram transferidos para um microtubo de 1,5 ml, que passou por mais uma centrifugação, o pellet foi ressuscitado com salina a 0,9% e foram armazenados em geladeira a 4° C para posterior medição da área celular (Figura 10E).

4.9 MEDIÇÃO DA ÁREA CELULAR DE CARDIOMIÓCITOS

Com os cardiomiócitos ventriculares isolados e fixados, foi realizada uma análise microscópica óptica em que se utilizou o software ZEN para realizar a medida da área celular (Figura 11).

Figura 9 - Medição da área de cardiomiócitos por microscopia óptica



Legenda: A linha vermelha delimita a célula para a determinação da área celular.

Fonte: autoria própria

4.10 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para a apresentação dos dados foi utilizado média \pm EPM e as análises de comparação foram feitas por ANOVA de uma via, seguida por pós-teste de Bonferroni.

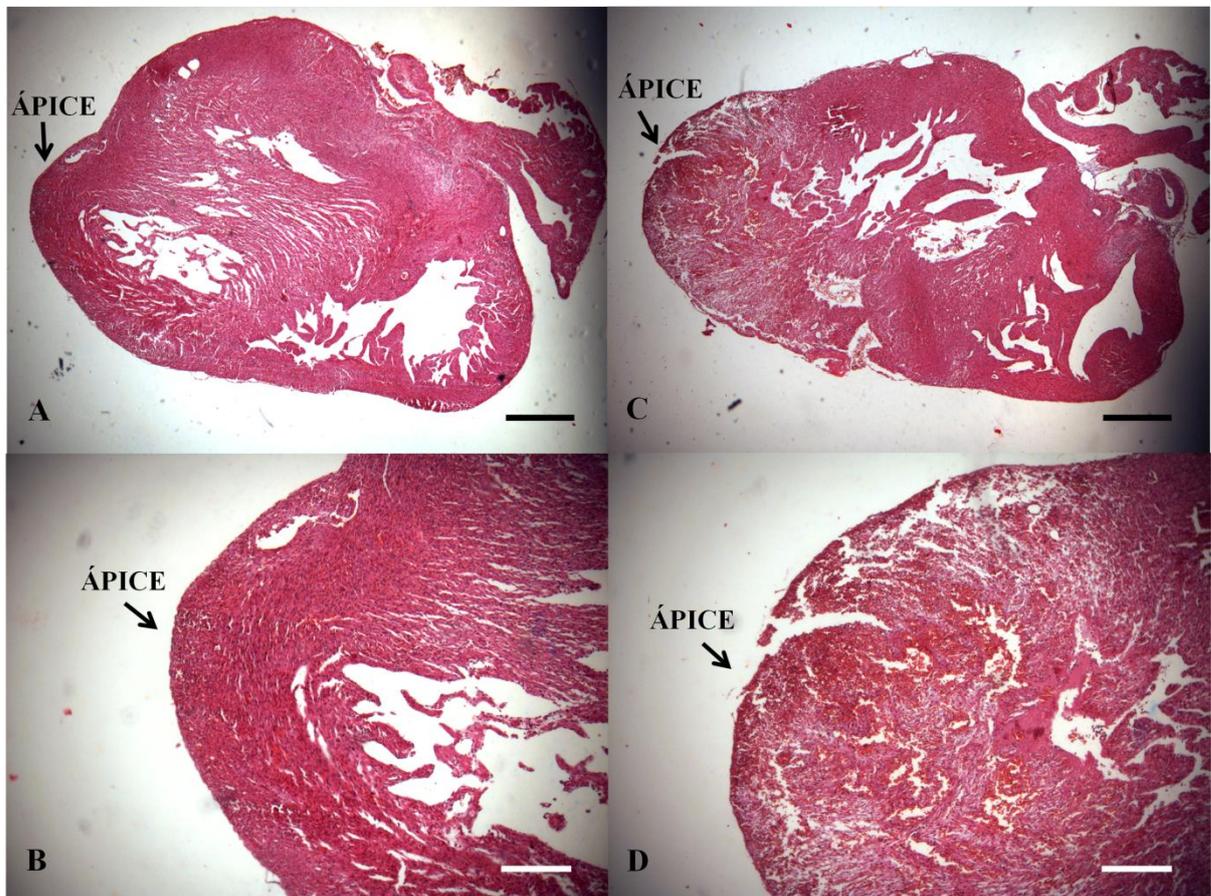
5 RESULTADOS

5.1 ANÁLISES HISTOLÓGICAS

5.1.1 Análise qualitativa da lesão cardíaca com coloração HE

Após a análise microscópica das lâminas que passaram pela coloração de HE, foi observado que a maior parte do coração é constituída por células do músculo cardíaco (coloração rosa). Ao comparar os corações sem lesão cardíaca (*sham*) (Figura 12A e 12B) e os que passaram pela cirurgia de crioinjúria (crio) (Figura 12C e 12D), nota-se que na região correspondente ao ápice cardíaco dos animais crio há um aspecto tecidual diferenciado em relação às outras regiões do órgão, com áreas mais brancas, indicando, com isso, ausência de células normais no tecido cardíaco e presença da injúria no coração.

Figura 10 - Visualização microscópica de histologia de coração de rato com coloração HE

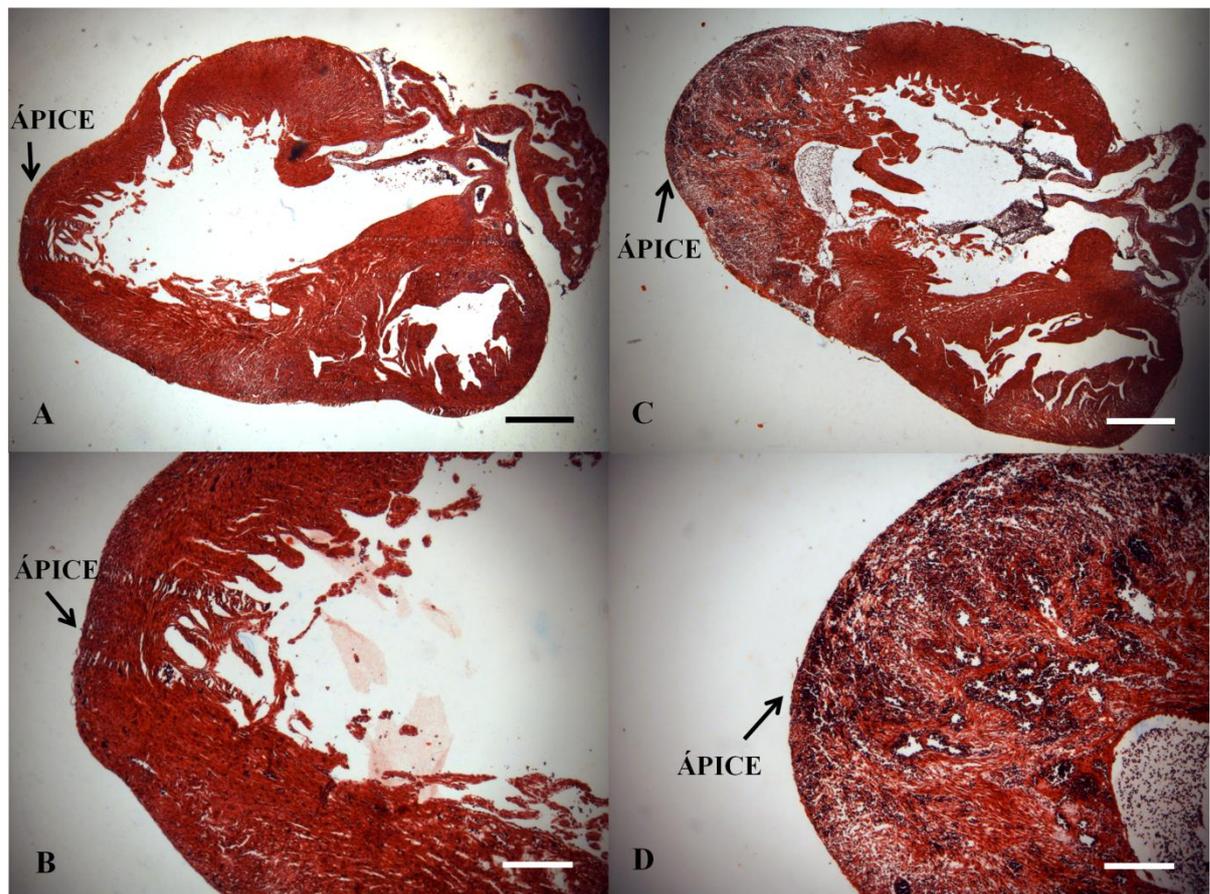


Legenda: corte histológico de coração de animal *sham* (A e B), corte histológico de coração de animal que passou pela cirurgia de crioinjúria (C e D). Todos os cortes passaram pela coloração com HE. Barra de escala de A e C: 500µm. Barra de escala de B e D: 200 µm.

5.1.2 Análise qualitativa da lesão cardíaca com coloração TM

Com a análise microscópica das lâminas coradas com o kit de Tricrômio de Masson, verificou-se a maior presença de células do músculo cardíaco com coloração vermelha. Em seguida, analisando os corações *sham* (Figura 13A e 13 B) e os que passaram pela cirurgia de crioinjúria (Figura 13C e 13D), verifica-se na região do ápice cardíaco dos animais crio uma coloração diferenciada, com áreas mais brancas indicando a presença da lesão cardíaca.

Figura 11 - Visualização microscópica de histologia de coração de rato com coloração TM



Legenda: corte histológico de coração de animal *sham* (A e B), corte histológico de coração de animal que passou pela cirurgia de crioinjúria (C e D). Todos os cortes passaram pela coloração com kit de Tricrômio de Masson. Barra de escala de A e C: 500µm. Barra de escala de B e D: 200 µm.

5.2 ANÁLISE DA FRAÇÃO DE EJEÇÃO POR MEIO DA ECOCARDIOGRAFIA

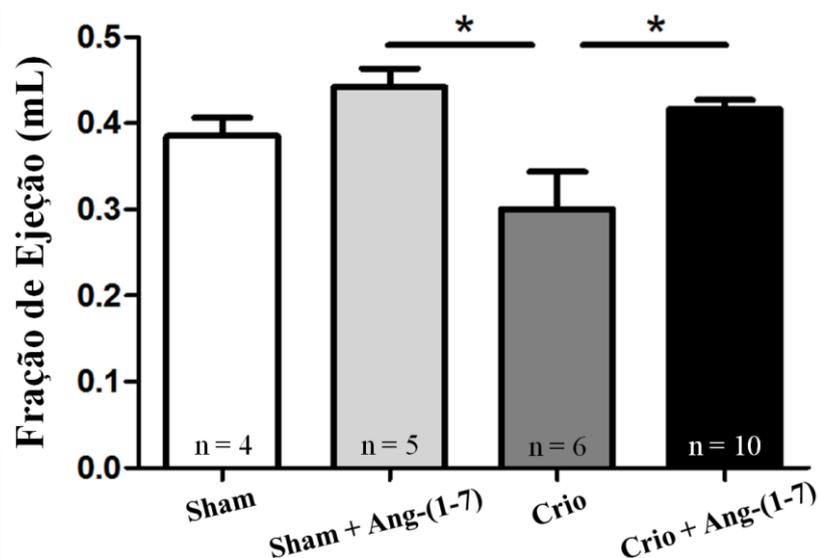
A partir da análise dos dados da ecocardiografia, observou-se que não houve diferença significativa na fração de ejeção dos animais que passaram pela indução do infarto agudo do

miocárdio por meio da crioinjúria (crio) quando comparados com o grupo controle (*sham*) (Figura 14). Apesar disso, foi observada uma tendência de redução da fração de ejeção nos animais crio em relação ao grupo controle. Essa tendência verificada nos animais crio pode ser explicada pelo aumento significativo dos diâmetros diastólico de aproximadamente 16,29% (Figura 15) e sistólico de aproximadamente 41,77% (Figura 16) comparados ao grupo controle. Com esse aumento, há um limite da fração de encurtamento, causando, com isso, prejuízos na fração de ejeção.

Além disso, foi verificado que os animais que após a crioinjúria receberam o tratamento com Ang-(1-7) [Crio + Ang-(1-7)] não tiveram prejuízo em sua fração de ejeção comparado com o grupo controle (Figura 14) e quando comparado com o grupo Crio, houve um aumento de 38,43% da fração de ejeção (Figura 14), indicando uma melhora na função cardíaca. Essa normalidade da fração de ejeção do grupo Crio + Ang-(1-7) comparado com o grupo *sham* também pode ser observada ao verificar a redução do diâmetro diastólico de aproximadamente 14,8% (Figura 15) e do sistólico de aproximadamente 25,91% (Figura 16), retomando, dessa forma, aos valores controle.

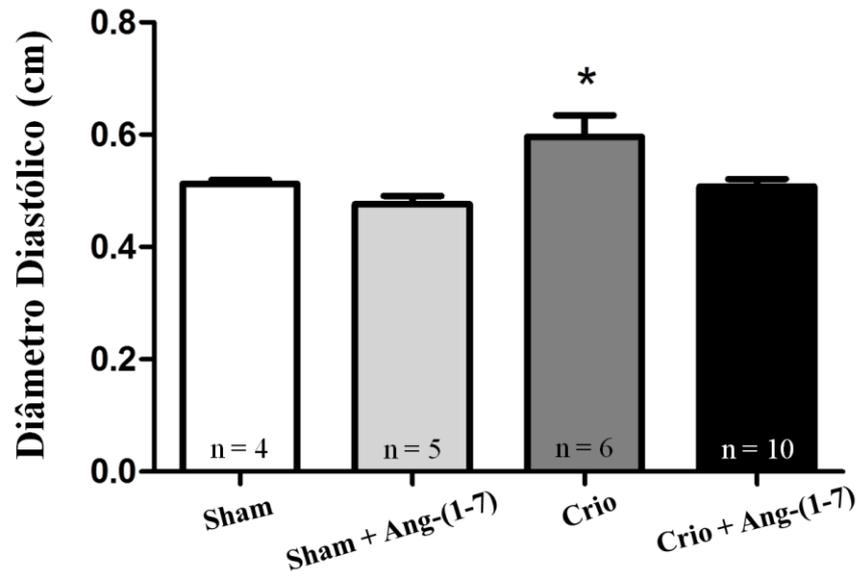
Adicionalmente, é possível verificar valores semelhantes da fração de ejeção e dos diâmetros diastólico e sistólico entre os animais dos grupos *sham* e *sham* + Ang-(1-7), indicando, portanto, que a Ang-(1-7) não exerce efeito em animais saudáveis.

Figura 12 - Fração de ejeção obtida das imagens no modo bidimensional da técnica de ecocardiografia



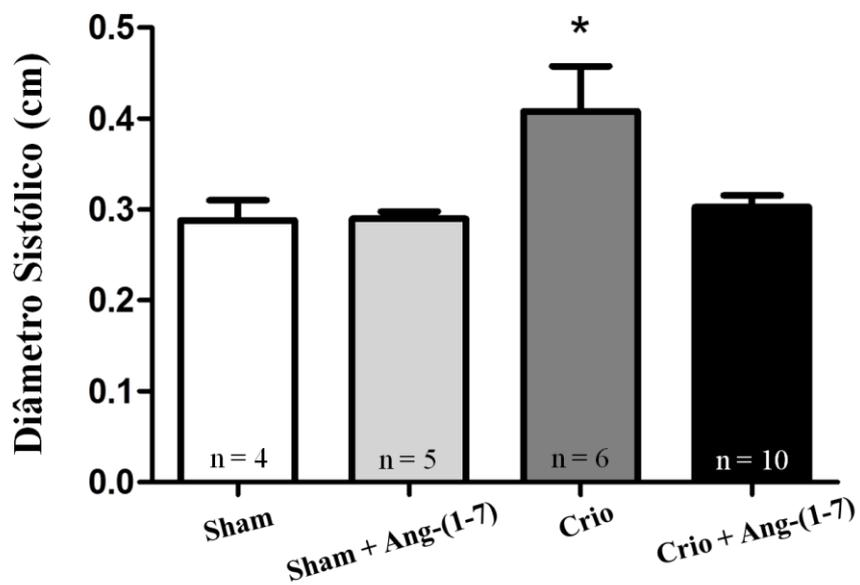
Legenda: *Sham*: animais controle sem tratamento; *sham+ang-(1-7)*: animais controle tratados com ang-(1-7); *Crio*: animais que sofreram a injúria, mas não tiveram tratamento; *Crio+ang-(1-7)*: animais que passaram pela crioinjúria e foram tratados com ang-(1-7). * $p < 0.05$ quando comparado com os dois grupos que envolvem a barra.

Figura 13 - Análise do Diâmetro Diastólico



Legenda: Os diâmetros foram obtidos das imagens no modo bidimensional do ecocardiograma realizado. *Sham*: animais controle sem tratamento; *sham+ang-(1-7)*: animais controle tratados com ang-(1-7); *Crio*: animais que sofreram a injúria, mas não tiveram tratamento; *Crio+ang-(1-7)*: animais que passaram pela crioinjúria e foram tratados com ang-(1-7). * $p < 0.05$ quando comparado com os demais grupos.

Figura 14 - Análise do Diâmetro Sistólico



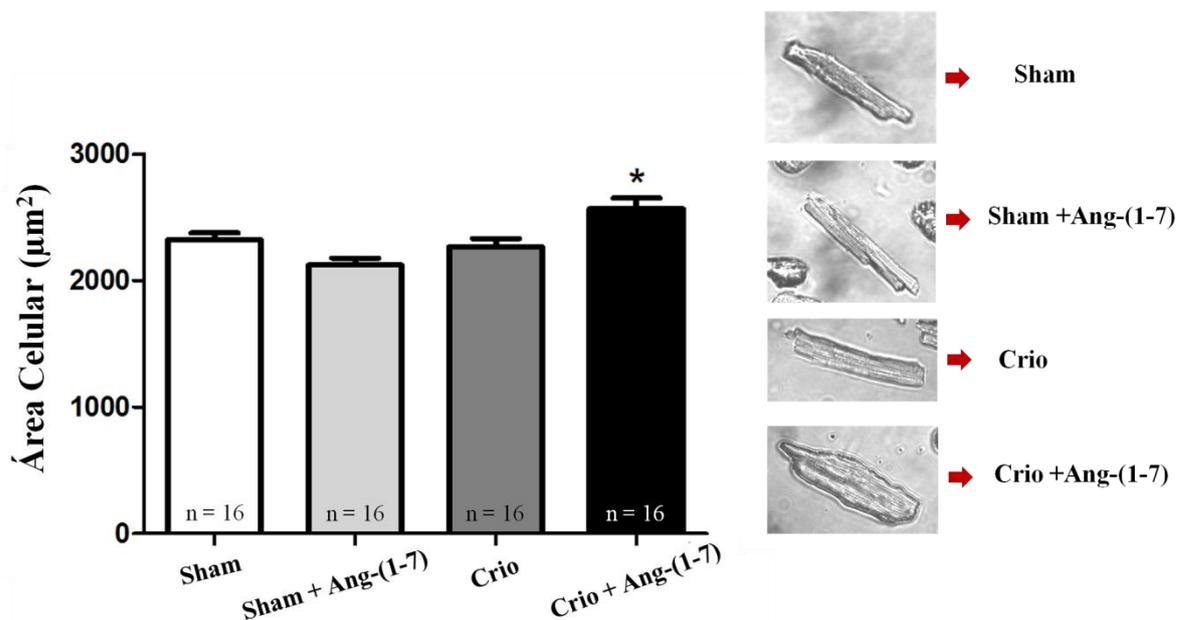
Legenda: Os diâmetros foram obtidos das imagens no modo bidimensional do ecocardiograma realizado. *Sham*: animais controle sem tratamento; *sham+ang-(1-7)*: animais controle tratados com ang-(1-7); *Crio*: animais que sofreram a injúria, mas não tiveram tratamento; *Crio+ang-(1-7)*: animais que passaram pela crioinjúria e foram tratados com ang-(1-7). * $p < 0.05$ quando comparado com os demais grupos.

5.3 ANÁLISE DAS ÁREAS DOS CARDIOMIÓCITOS

Ao analisar a área dos cardiomiócitos provenientes dos quatro grupos (Figura 17), verificou-se que apenas os animais do grupo que passou pela crioinjúria e teve posterior tratamento com Ang-(1-7) tiveram os cardiomiócitos significativamente maiores, correspondendo em média de 16,83% de aumento em relação ao grupo que passou apenas pela crioinjúria e não recebeu tratamento e 13,79% em relação ao grupo controle. Ademais, é notado que o grupo dos animais que sofreram apenas a lesão do miocárdio e não receberam tratamento com a Ang-(1-7) não tiveram um aumento celular significativo que caracterizaria uma hipertrofia (Figura 17).

Além disso, ao comparar os grupos *sham* e *sham + Ang-(1-7)* pode ser observado que a Ang-(1-7) não alterou significativamente os valores da área celular dos animais *sham*, indicando novamente que essa substância não promove efeitos em animais saudáveis.

Figura 15 - Área celular dos cardiomiócitos dos quatro grupos analisados por microscopia óptica



Legenda: *Sham*: animais controle sem tratamento; *sham+ang-(1-7)*: animais controle tratados com ang-(1-7); *Crio*: animais que sofreram a injúria, mas não tiveram tratamento; *Crio+ang-(1-7)*: animais que passaram pela crioinjúria e foram tratados com ang-(1-7). *P<0.05 quando comparado com os demais grupos.

6 DISCUSSÃO

No presente estudo identificamos que o método de crioinjúria foi eficiente em promover lesão cardíaca nos animais, bem como verificamos que a Ang-(1-7) promoveu melhoras na função cardíaca dos animais que sofreram a crioinjúria cardíaca. A seguir apresentaremos as principais discussões relacionadas aos nossos achados.

O citosol das células cardíacas foi corado em rosa nos corações que passaram pela coloração com HE (Figura 12) e em vermelho quando os cortes do tecido cardíaco foram submetidos à coloração com Tricrômio de Masson (Figura 13). Diante disso, após verificar que houve redução das áreas correspondentes ao citosol das células cardíacas através das lâminas histológicas, pode-se dizer que houve uma redução de tecido cardíaco normal, indicando, portanto, a presença da lesão induzida pela crioinjúria nos corações das lâminas que passaram por cada um dos dois tipos de coloração. Em consonância com nosso estudo, Polizzotti e colaboradores (2015) também analisaram de forma histológica corações de ratos neonatos *sham* e que passaram pela crioinjúria. Com esse experimento, os autores puderam perceber que houve formação de cicatriz na região do coração dos animais lesionados quando comparados com o grupo sem lesão, evidenciando, portanto, que a crioinjúria é uma técnica adequada para instalar uma lesão no tecido cardíaco.

Os dois tipos de coloração originaram os mesmos resultados em nosso estudo. No entanto, apesar de corarem adequadamente o tecido cardíaco, eles possuem diferenças entre si. A principal delas é que a coloração com TM destaca bem tecido fibrótico que será mais bem evidenciado em corações retirados após um maior período depois da indução da lesão pela crioinjúria, já a coloração com HE não evidencia muito bem esse tecido.

Com a análise ecocardiográfica, observou-se que os animais que sofreram a crioinjúria não apresentaram diferença estatística significativa na fração de ejeção quando comparados com o grupo controle. No entanto, observou-se uma tendência de redução desse parâmetro. Estudos de Polizzotti e colaboradores (2015) demonstraram através da técnica de ecocardiografia que com a crioinjúria houve redução da fração de ejeção. Essa tendência na redução da fração de ejeção pode ser atribuída à perda de células cardíacas e a não regeneração do tecido devido à saída dos cardiomiócitos do ciclo celular. Corroborando com essa tendência, Porrello e colaboradores (2011) induziram a perda de células utilizando a técnica cirúrgica de ressecção apical de corações de animais. Ao utilizar também animais com 7 dias de vida, eles observaram que os corações desses animais não conseguiram regenerar seus tecidos após terem sido submetidos a uma perda de células. Além disso, eles também

verificaram a formação de tecido fibroso indicando novamente que o tecido cardíaco não foi recuperado.

Com a ecocardiografia também foi possível observar que o tratamento com Ang-(1-7) em animais submetidos à crioinjúria foi eficaz em preservar a fração de ejeção do coração. MARQUES e colaboradores (2012) induziram o infarto no miocárdio (IM) em ratos através da ligadura da artéria coronária esquerda e os trataram com Ang-(1-7). Ao observar a fração de ejeção desses animais pela técnica de ecocardiografia, verificaram também que a Ang-(1-7) melhorou significativamente a fração de ejeção dos animais que passaram pelo IM. Além disso, Santos e colaboradores (2006) corroboram com esses resultados, pois através de análises ecocardiográficas, também verificaram que a Ang-(1-7), quando age em seu receptor Mas, desempenha um papel essencial para manter a estrutura e função do coração.

Ao analisar os diâmetros diastólico e sistólico das cavidades ventriculares dos animais que sofreram crioinjúria, observou-se que esses animais apresentaram aumento nos diâmetros diastólico e sistólico. No entanto, outros trabalhos tiveram resultados diferentes como o estudo realizado por Porrello e colaboradores (2011) que, ao realizarem a ecocardiografia em animais com 1 dia de vida submetidos a cirurgia de ressecção apical de coração, perceberam a melhora da função cardíaca com função sistólica normal pois, como os neonatos com 1 dia de vida ainda se encontram na janela proliferativa dos cardiomiócitos a perda de células nessa fase do desenvolvimento ainda pode ser reparada.

Na análise dos diâmetros diastólico e sistólico das cavidades ventriculares dos animais tratados com Ang-(1-7), foi verificado que, após o tratamento, os valores retomaram aos níveis controle, mostrando que esse peptídeo é fundamental para a melhora da função cardíaca principalmente após uma perda de cardiomiócitos. Outros estudos também mostraram o importante papel da Ang-(1-7) no coração, como o realizado por Santos e colaboradores (2006), que ao realizarem a ecocardiografia em camundongos com deficiência do receptor Mas, receptor da Ang-(1-7), foi observado redução significativa do encurtamento fracionário, da espessura da parede posterior na sístole e da dimensão diastólica final do ventrículo esquerdo. Adicionalmente, observou-se uma maior dimensão sistólica final do ventrículo esquerdo, mostrando, com isso, a importância da Ang-(1-7).

Adicionalmente, ao relacionar os grupos *sham* e *sham* + Ang-(1-7), verifica-se que não houve diferença estatística nos valores da fração de ejeção e diâmetros diastólico e sistólico, indicando que a Ang-(1-7) não age em animais saudáveis. Em consonância com esse resultado, QI e colaboradores (2011) ao induzirem a superexpressão de Ang-(1-7) mediada por lentivírus verificaram que essa substância também não exercia efeito na fração de

encurtamento de animais controle. A fração de encurtamento é calculada utilizando os diâmetros diastólico e sistólico para a obtenção dos resultados de fração de ejeção, o que pode então explicar a manutenção dos valores semelhantes aos controle desses parâmetros em nosso estudo.

O protocolo experimental seguinte visou analisar a área dos cardiomiócitos dos animais provenientes dos quatro grupos. Os animais que sofreram crioinjúria e foram tratados com a Ang-(1-7) tiveram os cardiomiócitos significativamente maiores. Esse aumento da área celular pode ser atribuído à hipertrofia dos cardiomiócitos que consiste no aumento das dimensões dos cardiomiócitos como mecanismo adaptativo do coração (FRANCHINI, 2001), ou à proliferação celular que se caracteriza por inicialmente induzir o aumento da área celular para que haja duplicação de seu conteúdo como proteínas, organelas e material genético, para, em seguida, promover a divisão celular (ALBERTS, 2010). No entanto, alguns pontos devem ser levados consideração.

Sabe-se que a Ang-(1-7) é classicamente reconhecida por ter uma atividade anti-hipertrofica como observado por Gomes e colaboradores (2010). Além disso, quando há hipertrofia, o aumento da área celular é muito mais pronunciado do que o observado em nosso estudo, como verificado também por Gomes e colaboradores (2010) que obtiveram 65% de aumento da área celular promovido pela hipertrofia induzida pela Ang II, enquanto que em nosso estudo foi observado 13,79% de aumento da área celular em relação ao grupo controle. Adicionalmente, como visto em nosso estudo ao analisar a fração de ejeção, pode-se notar que a Ang-(1-7) melhorou a função cardíaca. Por fim, outros estudos realizados em nosso laboratório já observaram também que a Ang-(1-7) induziu a proliferação dos cardiomiócitos como foi verificado por Gomes (2017).

Ademais, é notado que o grupo dos animais que sofreram apenas a lesão do miocárdio e não receberam tratamento com a Ang-(1-7) não tiveram um aumento celular significativo que caracterizaria uma hipertrofia, isso provavelmente se deve ao fato de que no momento da crioinjúria o animal ainda estava no processo de seu desenvolvimento fazendo com que o organismo do neonato reparasse naturalmente o dano causado no tecido cardíaco.

Além disso, foi observado que a Ang-(1-7) não exerce efeitos em animais saudáveis visto que ao comparar os grupos *sham* e *sham* + Ang-(1-7) não foi verificado diferença estatística nos valores da área celular entre esses grupos. Corroborando com esse resultado, Gomes e colaboradores (2010), também observaram que o tratamento de animais controle apenas com Ang-(1-7) não alterou significativamente a área de superfície celular, indicando que a Ang-(1-7) realmente não possui atividade em animais saudáveis.

7 CONCLUSÃO

Mediante os resultados apresentados foi possível confirmar a presença da lesão cardíaca após a indução do infarto agudo do miocárdio por meio da crioinjúria. Além disso, pôde-se identificar que a Ang-(1-7) melhora a fração de ejeção nos animais infartados, conduz os diâmetros diastólico e sistólico para valores controle mesmo após uma lesão cardíaca e provoca inicialmente um aumento da área celular dos cardiomiócitos de ratos que sofreram a crioinjúria sugerindo, portanto, cardioproteção e indicativo de proliferação de cardiomiócitos.

A partir desse estudo, verifica-se que há diversas evidências indicando a capacidade de proliferação dos cardiomiócitos induzida pela angiotensina-(1-7). Com isso, pode-se avançar nas pesquisas para desenvolvimento de novos tratamentos mais eficazes contra diversos tipos de doenças cardiovasculares. Dessa forma, minimizando os problemas causados por elas, reduzindo o índice de mortes e melhorando a qualidade de vida dos pacientes.

REFERÊNCIAS

- ALBERTS, B. *Biologia Molecular da Célula*. 5ª edição (**Artmed**). Porto Alegre. 2010. 1054-1055.
- BENJAMIN, E. J. et al. Heart disease and stroke statistics-2018 update: a report from the American Heart Association. **Circulation**, v. 137, n. 12, p. e67, 2018.
- BENTER, I. F. et al. Angiotensin-(1-7) prevents development of severe hypertension and end-organ damage in spontaneously hypertensive rats treated with L-NAME. **American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology**, v. 290, n. 2, p. H684 –H691, 2006.
- BERGMANN, O. et al. Evidence for cardiomyocyte renewal in humans. **Science**, v. 324, n. 5923, p. 98-102, 2009.
- BERSELL, K. et al. Neuregulin1/ErbB4 signaling induces cardiomyocyte proliferation and repair of heart injury. **Cell**, v. 138, n. 2, p. 257-270, 2009.
- CASTRO, C. H. **Avaliação dos efeitos da angiotensina-(1-7) e do seu receptor mas no controle da função cardíaca utilizando animais geneticamente modificados**. 2008. 114. Doutorado em Fisiologia e Farmacologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2008.
- COHEN, E. D.; TIAN, Y.; MORRISEY, E. E. Wnt signaling: an essential regulator of cardiovascular differentiation, morphogenesis and progenitor self-renewal. **Development**, v. 135, n. 5, p. 789-798, 2008.
- DATASUS. **Infarto agudo do miocárdio é primeira causa de mortes no País, revela dados do DATASUS**. 2014. Disponível em: <<http://datasus.saude.gov.br/noticias/atualizacoes/559-infarto-agudo-do-miocardio-e-primeira-causa-de-mortes-no-pais-revela-dados-do-datasus>>. Acesso em: 06 de Agosto de 2018.
- DAVIES, M. J. The pathophysiology of acute coronary syndromes. **Heart**, v. 83, n. 3, p. 361-366, 2000.
- DE OLIVEIRA, E. M.; ALVES, G. B.; BARAUNA, V. G. Sistema renina-angiotensina: interação gene–exercício. **Revista Brasileira de Hipertensão**, v. 10, n. 2, p. 125-129, 2003.
- DIAS-PEIXOTO, M. F. et al. Molecular mechanisms involved in the angiotensin-(1-7)/Mas signaling pathway in cardiomyocytes. **Hypertension**, v. 52, n. 3, p. 542-548, 2008.
- DORN, G. W.; FORCE, T. Protein kinase cascades in the regulation of cardiac hypertrophy. **The Journal of clinical investigation**, v. 115, n. 3, p. 527-537, 2005.
- DRENCKHAHN, J.D. et al. Compensatory growth of healthy cardiac cells in the presence of diseased cells restores tissue homeostasis during heart development. **Developmental cell**, v. 15, n. 4, p. 521-533, 2008.

- ENGEL, F. B. et al. p38 MAP kinase inhibition enables proliferation of adult mammalian cardiomyocytes. **Genes & development**, v. 19, n. 10, p. 1175-1187, 2005.
- FERNANDES, M. R.; PERIN, E. C. Regeneração cardíaca. Coração: um órgão pós-mitótico?. **Revista Brasileira de Cardiologia Invasiva**, v. 15, n. 1, p. 61-69, 2007.
- FERRARIO, C. M. et al. Counterregulatory actions of angiotensin-(1-7). **Hypertension**, v. 30, n. 3, p. 535-541, 1997.
- FERREIRA, A. J.; SANTOS, R. A. S.; ALMEIDA, A. P. Angiotensin-(1-7): cardioprotective effect in myocardial ischemia/reperfusion. **Hypertension**, v. 38, n. 3, p. 665-668, 2001.
- FERREIRA, A. J.; SANTOS, R. A. S.; ALMEIDA, A. P. Angiotensin-(1-7) improves the post-ischemic function in isolated perfused rat hearts. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 35, n. 9, p. 1083-1090, 2002.
- FRANCHINI, Kleber G. Hipertrofia cardíaca: mecanismos moleculares. **Revista Brasileira de Hipertensão**, v. 8, n. 1, p. 125-42, 2001.
- GOMES, E. R. M. et al. Angiotensin-(1-7) Prevents Cardiomyocyte Pathological Remodeling Through a Nitric Oxide/Guanosine 3', 5'-Cyclic Monophosphate-Dependent Pathway. **Hypertension**, v. 55, n. 1, p. 153-160, 2010.
- GOMES, F. D. L. **Ações da angiotensina-(1-7) na proliferação de cardiomiócitos e regeneração cardíaca**. 2017. 57. Graduação em Farmácia, Universidade Federal da Paraíba, 2017.
- GOMES, E. R. M.; SANTOS, R. A. S.; GUATIMOSIM, S. Angiotensin-(1-7)-mediated signaling in cardiomyocytes. **International journal of hypertension**, v. 2012, 2012.
- HEALLEN, T. et al. Hippo signaling impedes adult heart regeneration. **Development**, v. 140, n. 23, p. 4683-4690, 2013.
- JESSUP, J. A. et al. Localization of the novel angiotensin peptide, angiotensin-(1-12), in heart and kidney of hypertensive and normotensive rats. **American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology**, v. 294, n. 6, p. H2614-H2618, 2008.
- JOPLING, C. et al. Zebrafish heart regeneration occurs by cardiomyocyte dedifferentiation and proliferation. **Nature**, v. 464, n. 7288, p. 606, 2010.
- KÜHN, B. et al. Periostin induces proliferation of differentiated cardiomyocytes and promotes cardiac repair. **Nature medicine**, v. 13, n. 8, p. 962, 2007.
- LOUCH, W. E.; SHEEHAN, K. A.; WOLSKA, B. M. Methods in cardiomyocyte isolation, culture, and gene transfer. **Journal of molecular and cellular cardiology**, v. 51, n. 3, p. 288-298, 2011.
- MENARD, J. Anthology of the renin-angiotensin system: a one hundred reference approach to angiotensin II antagonists. **Journal of hypertension. Supplement: official journal of the International Society of Hypertension**, v. 11, n. 3, p. S3-11, 1993.
- MAHMOUD, A. I. et al. Surgical models for cardiac regeneration in neonatal mice. **Nature protocols**, v. 9, n. 2, p. 305, 2014.

MARQUES, F. D. et al. Beneficial effects of long-term administration of an oral formulation of Angiotensin-(1–7) in infarcted rats. **International journal of hypertension**, v. 2012, 2012.

MOZAFFARIAN, D. et al. Executive summary: heart disease and stroke statistics—2015 update: a report from the American Heart Association. **Circulation**, v. 131, n. 4, p. 434-441, 2015.

NEW YORK STATE. **Types of cardiovascular disease**. 2012. Disponível em: <https://www.health.ny.gov/diseases/cardiovascular/heart_disease/types_of_cv.htm>. Acesso em: 27 de Março de 2019.

OMS. **Doenças cardiovasculares**. 2017. Disponível em:<https://www.paho.org/bra/index.php?option=com_content&view=article&id=5253:doen-cas-cardiovasculares&Itemid=839>. Acesso em: 06 de Agosto de 2018.

PLANA, J. C. et al. Expert consensus for multimodality imaging evaluation of adult patients during and after cancer therapy: a report from the American Society of Echocardiography and the European Association of Cardiovascular Imaging. **European Heart Journal—Cardiovascular Imaging**, v. 15, n. 10, p. 1063-1093, 2014.

POLIZZOTTI, B. D. et al. Neuregulin stimulation of cardiomyocyte regeneration in mice and human myocardium reveals a therapeutic window. **Science translational medicine**, v. 7, n. 281, p. 281ra45-281ra45, 2015.

PONNUSAMY, M.; LI, P.F.; WANG, K. Understanding cardiomyocyte proliferation: an insight into cell cycle activity. **Cellular and molecular life sciences**, v. 74, n. 6, p. 1019-1034, 2017.

PORRELLO, E. R. et al. Transient regenerative potential of the neonatal mouse heart. **Science**, v. 331, n. 6020, p. 1078-1080, 2011.

POSS, K. D.; WILSON, L. G.; KEATING, M. T. Heart regeneration in zebrafish. **Science**, v. 298, n. 5601, p. 2188-2190, 2002.

QI, Y. et al. Lentivirus-mediated overexpression of angiotensin-(1–7) attenuated ischaemia-induced cardiac pathophysiology. **Experimental physiology**, v. 96, n. 9, p. 863-874, 2011.

REBOUÇAS, J.S.; SANTOS-MAGALHÃES, N. S.; FORMIGA, F. R. Regeneração Cardíaca com Fatores de Crescimento: Avanços e Desafios. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 107, n. 3, p. 271-275, 2016.

ROCHA, R. M. Epidemiologia das Doenças Cardiovasculares e Fatores de Risco. In: SOCERJ. Manual de prevenção cardiovascular. 1ª ed. São Paulo: **Planmark**; Rio de Janeiro: SOCERJ - Sociedade de Cardiologia do Estado do Rio de Janeiro, 2017.

RUMYANTSEV, P. P. Interrelations of the proliferation and differentiation processes during cardiac myogenesis and regeneration. **International review of cytology**, Academic Press, v. 51, p. 187-273, 1977.

SAMPAIO, W. O. et al. Angiotensin-(1-7) through receptor Mas mediates endothelial nitric oxide synthase activation via Akt-dependent pathways. **Hypertension**, v. 49, n. 1, p. 185-192, 2007.

SANTOS, R. A. S. et al. Angiotensin-(1-7) is an endogenous ligand for the G protein-coupled receptor Mas. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 100, n. 14, p. 8258-8263, 2003.

SANTOS, R. A. S. et al. Impairment of in vitro and in vivo heart function in angiotensin-(1-7) receptor MAS knockout mice. **Hypertension**, v. 47, n. 5, p. 996-1002, 2006.

SCORSIN, M.; GUARITA-SOUZA, L. C. O transplante celular no tratamento da insuficiência cardíaca. **Revista Brasileira de Cirurgia Cardiovascular**, v. 16, n. 3, p. 183-186, 2001.

SIMONE, G. et al. Left ventricular mass and body size in normotensive children and adults: assessment of allometric relations and impact of overweight. **Journal of the American College of Cardiology**, v. 20, n. 5, p. 1251-1260, 1992.

SOCERJ. Doença Coronariana. 2013. Disponível em: <<https://socerj.org.br/doenca-coronariana/>>. Acesso em: 27 de Março de 2019.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE CARDIOLOGIA. **O Cardiômetro**. 2015a. Disponível em: <<http://www.cardiometro.com.br/default.asp>>. Acesso em: 22 de Março de 2019.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE CARDIOLOGIA. **Anos Anteriores**. 2015b. Disponível em: <<http://www.cardiometro.com.br/anteriores.asp>>. Acesso em: 22 de Março de 2019.

SOUZA, L. C. G. et al. O transplante de células mioblásticas esqueléticas e de células cardíacas no infarto do miocárdio. **Revista Brasileira de Cirurgia Cardiovascular**, v. 17, n. 4, p. 312-322, 2002.

TORTORA, G. J.; DERRICKSON, B. **Corpo Humano: Fundamentos de Anatomia e Fisiologia**. 10ª edição (Artmed). Porto Alegre. 2016. 704.

TOWNSEND, N. et al. Cardiovascular disease in Europe—epidemiological update 2015. **European heart journal**, v. 36, n. 40, p. 2696-2705, 2015.

TUCCI, P. J. F. Características fisiopatológicas do modelo de insuficiência cardíaca pós-infarto do miocárdio no rato. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 96, n. 5, p. 420-424, 2011.

UMAR, S.; VAN DER LAARSE, A. Nitric oxide and nitric oxide synthase isoforms in the normal, hypertrophic, and failing heart. **Molecular and cellular biochemistry**, v. 333, n. 1-2, p. 191, 2010.

XIN, M. et al. Regulation of insulin-like growth factor signaling by Yap governs cardiomyocyte proliferation and embryonic heart size. **Science Signaling**, v. 4, n. 196, p. ra70-ra70, 2011.

XIN, M. et al. Hippo pathway effector Yap promotes cardiac regeneration. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 110, n. 34, p. 13839-13844, 2013.

WHO. **Cardiovascular diseases (CVDs)**. 2017. Disponível em: <[https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/cardiovascular-diseases-\(cvds\)](https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/cardiovascular-diseases-(cvds))>. Acesso em: 22 de Março de 2019.

WHO. World health statistics 2018: monitoring health for the SDGs, sustainable development goals. **World Health Organization**. 2018a.

WHO. **The top 10 causes of death**. 2018b. Disponível em: <<https://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/the-top-10-causes-of-death>>. Acesso em: 23 de Março de 2018.

YUTZEY, K. E. Cardiomyocyte Proliferation: teaching an old dogma new tricks. **Circulation research**, v. 120, n. 4, p. 627-629, 2017.

ZHOU, Q. et al. The hippo pathway in heart development, regeneration, and diseases. **Circulation research**, v. 116, n. 8, p. 1431-1447, 2015.