



Número do Trabalho - P278

VIAS DE SINALIZACAO ATIVADAS PELOS NOVOS AGONISTAS DO RECEPTOR MAS, CGEN-856S E CGEN-857V, EM CARDIOMIÓCITOS

AUTOR(ES): Nocchi E; Resende CR; Almeida PWM; Parreira AB; Scalzo Junior SRA; Santos RAS; Guatimosim S;

INSTITUIÇÃO: Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais

INTRODUÇÃO: Tendo em vista a descoberta do efeito cardioprotetor do eixo angiotensina-(1-7) / Mas, estudos com intuito de se descobrir novos peptídeos agonistas potenciais do receptor MAS são fundamentais. Assim, foram descobertos dois novos peptídeos agonistas do receptor MAS, o CGEN-856S e CGEN-857V (Shemesh et al., 2008). O efeito cardioprotetor in vivo destes peptídeos foi confirmado por Savegnini et al. (2010). **OBJETIVOS:** Investigar as vias de sinalização envolvidas no efeito cardioprotetor dos novos agonistas do receptor MAS, CGEN-856S e CGEN-857V. **CAUSUÍSTICA E MÉTODOS:** Para analisarmos a produção de óxido nítrico (NO) pelos cardiomiócitos, células isoladas foram tratadas com os peptídeos durante 30 minutos e em seguida incubadas com uma sonda sensível ao óxido nítrico (DAF-FM). Após o período de incubação, os cardiomiócitos foram analisados utilizando microscopia confocal. Para desvendarmos possíveis vias intracelulares envolvidas na produção de óxido nítrico e no efeito anti-hipertrófico do CGEN-856S e CGEN-857V foram utilizadas as técnicas de western-blot e imunofluorescência. **RESULTADOS:** Os cardiomiócitos isolados foram tratados com CGEN-856S nas concentrações de 1µM, 100nM e 10nM. Em todas as concentrações houve um aumento significativo na produção de NO (14.73%, 20.67%, 21.76%, respectivamente). Os cardiomiócitos também foram tratados com CGEN-857V utilizando as mesmas concentrações. Foi observado, também, um aumento significativo da produção de NO (15.14%, 12.76%, 14.05%, respectivamente). Ao tratarmos cardiomiócitos de camundongos com deleção do receptor MAS, não foi observada aumento na produção de NO. Para investigar a via de sinalização intracelular envolvida neste efeito realizamos a técnica de Western-blot para quantificarmos fosforilação da AKT, proteína alvo da via de sinalização da Ang-(1-7) ao se ligar ao receptor MAS. Observou-se aumento significativo da fosforilação da AKT em resposta ao CGEN-856S. Paralelamente o potencial anti-hipertrófico do CGEN-856S foi avaliado em cultura de cardiomiócitos neonatais tratados com agente hipertrófico Angiotensina II (Ang II). Cardiomiócitos tratados com Ang II por 36 horas apresentaram um aumento significativo da área (~40%), efeito este revertido quando os cardiomiócitos foram tratados concomitantemente com Ang II e CGEN-856S. CGEN-856S também antagonizou a translocação para o núcleo do fator de transcrição pró-hipertrófico GRK-5 em resposta a Ang II. **CONCLUSÕES:** Os novos agonistas do receptor MAS são eficientes na ativação de vias cardioprotetoras na célula cardíaca que levam a produção de óxido nítrico e a inibição da translocação do fator anti-hipertrófico GRK5 em resposta a Ang II.



Número do Trabalho - P165

TREINAMENTO FÍSICO RESTAURA a EXPRESSÃO DO microRNA-29c CARDÍACO DIMINUINDO O COLÁGENO E PREVENINDO A HIPERTROFIA CARDÍACA PATOLÓGICA EM RATOS ZUCKER OBESOS

AUTOR(ES): Silveira AC; Fernandes T; Soci UR; Oliveira EM;

INSTITUIÇÃO: Escola de Educação Física e Esporte, Universidade de São Paulo

Introdução: Uma nova classe de pequenos RNAs, denominados de microRNAs (miRNAs), vem sendo muito estudados ao longo da última década por regularem pós-transcricionalmente a expressão de seus genes alvos. Estudos recentes mostram uma redução na expressão do miRNA-29 acompanhado por um aumento do colágeno na hipertrofia cardíaca (HC) patológica induzida por sobrecarga pressórica, entretanto, não há estudos sobre os efeitos do treinamento físico (TF) em ratos obesos sobre a expressão de miRNAs cardíacos. **Objetivo:** O objetivo do estudo foi avaliar o efeito do TF aeróbio sobre a HC, fibrose e conteúdo de gordura cardíaca em ratos Zucker obesos e investigar o papel do miRNA-29c nesta regulação. **Materiais e métodos:** Grupos experimentais: 1) grupo magro (GM), 2) grupo obeso (OB), 3) grupo magro treinado (GMTR), 4) grupo obeso treinado (OBTR). O TF de natação consistiu de 10 semanas de duração, sessões de 60 min, 1x/dia, 5x/sem com 4% do peso corporal. Foram analisados a pressão arterial (PA) e a frequência cardíaca (FC) no repouso por pletismografia de cauda. A HC foi avaliada pela razão entre o peso do ventrículo esquerdo (VE) e o comprimento da tíbia (TI) e pelo diâmetro dos cardiomiócitos. A fração de gordura cardíaca (%GC) intramuscular foi avaliada por oil red. Foi avaliado a fração de colágeno cardíaco por picrossírius red e por hidroxiprolina (OH-Pro). Também foi realizado a expressão gênica do colágeno tipo I e III (COLIAI e COLIIIAI) e do miRNA 29c por real-time PCR. **Resultados:** A PA não se alterou, entretanto a FC diminuiu nos grupos treinados (MGTR: 380±12; OBTR: 383±6 bpm) versus sedentários (MG: 435± 14; OB: 433±20 bpm). Não houve diferença no diâmetro dos cardiomiócitos. No entanto, a razão VE/TI foi menor no grupo OBTR (2,3± 0,1 g/cm) comparado ao OB (2,67±0,1 g/cm) e maior em ambos os grupos obesos em relação aos grupos magros (MG 1,95±0,1; MGTR 1,8±0,1 g/cm). A %GC estava diminuída no grupo OBTR comparado ao OB, sem diferença entre os grupos magros (MG 25±1,55 g; MGTR 22,5±0,59 g; OBSD 26±1,86 g; OBTR 22,9±1,53 g). A expressão de miRNA-29c estava diminuída no OB (43±10,6 %) comparado aos outros grupos (MG 100±36,1 %; MGTR 92±13,6 %; OBTR 118±54,1 %). A fração de colágeno foi menor para OBTR versus OB e sem diferença nos grupos magros (MG 14,419±1,29 %; MGTR 15,872±2,37 %; OB 21,214±1,18 %; OBTR 17,197±2,98 %). Similar, o conteúdo de OH-Pro foi menor em MGTR em relação a MG e tendeu a diminuir em OBTR comparado a OB (MG 270,1±47,7 µg/g ; MGTR 137,4±21,1 µg/g; OB 291,19±50,8 µg/g; OBTR 231,4±37,5 µg/g). A expressão de COLIAI tendeu diminuir em MGTR comparado à OB e COLIII não foi diferente entre os grupos. **Conclusão:** O TF induziu a diminuição da gordura intramuscular e do colágeno cardíaco, sendo capaz de reverter aspectos patológicos da HC induzida pela obesidade. Esta reversão possivelmente está associada à normalização da expressão do miRNA-29c que regula componentes de matriz extracelular.



Número do Trabalho - P295

IMMUNOFLUORESCENCE DETECTION OF MRGD EXPRESSION IN RODENTS

AUTOR(ES): Oliveira AC; Peluso AAB; Quadri F; Alenina N; Bader M; Santos RAS;

INSTITUIÇÃO: Federal University of Minas Gerais

Recently a new peptide was discovered as part of the Renin Angiotensin System (RAS), the heptapeptide alamandine [Ala¹-Ang-(1-7)]. This new component is a product of the catalytic hydrolysis of Angiotensin A or can also be formed from decarboxilation of Angiotensin-(1-7). Interestingly, Alamandine effects were independent of Angiotensin-(1-7) receptor Mas and the Mas-related G protein receptor member D (MrgD) was described as an Alamandine receptor. Previous studies have reported that MrgD is expressed predominantly in small diameter IB4(+) neurons in the dorsal root ganglion (DRG). However, functional experiments performed in our lab showed that alamandine has antihypertensive and cardioprotective effects, indicating that MrgD might be also expressed in another tissues. Objective: Identify the anatomical localization of MrgD receptors in blood vessels, heart and in cardiovascular-related centers of the mouse brain. Materials and Methods: Mice were euthanized by overdose of isoflurane anesthesia and then perfused transcardially with PBS (0.02 M, pH 7.4) for 2 min followed by 10% paraformaldehyde in PBS (0.02 M, pH 7.4) for 10 min. Brain was removed and postfixed for 24 h in 10% paraformaldehyde in PBS (0.02 M, pH 7.4), and then placed in 30% sucrose solution overnight. Aorta was collected and immediately frozen in dry ice with OCT, and we also performed cell culture for cardiomyocytes. Serial sections with 10 or 30 μ m were then made in a cryostat for aorta and brain respectively. Sections were hydrated with PBS (0.02 M, pH 7.4) and permeabilized with 0.2% Tween 20, and the nonspecific staining was blocked with 5% bovine serum albumin (BSA), for 1 hour. Sequentially, the tissues were incubated with a rabbit anti-MrgD primary antibody (1:300) at 4 deg C overnight. The sections were then incubated with an Alexa 488-labeled anti-rabbit secondary antibody during 1 h at room temperature. After incubation, sections were washed with PBS (0.02 M, pH 7.4) and were mounted, and coverslipped with Vecta-shield mounting medium with the nuclear marker, DAPI. Control staining was not incubated with anti-MrgD primary antibody. Immunostaining specificity was characterized by performing experiments using MrgD receptor knockout mice as control. There was positive fluorescence only in WT animals, demonstrating the specificity of the antibody used in the subsequent experiments. Results: Differently than that described before, MrgD expression is not restricted to neurons at DRG. Immunofluorescence for MrgD receptor was detected in many centers of the mouse brain. The strongest labeling was observed throughout the trigeminal tract, but was also detected in the Cerebellum, Cortex, Insular Cortex, Hypothalamus and in some nuclei of the brainstem. In addition, corroborating previous functional studies from our laboratory showing that Alamandine has an endothelium-dependent vasorelaxant effect, we also observed positive fluorescence in aorta endothelial cells, expanding the evidence that alamandine-induced effects are mediated by MrgD receptor. Moreover, MrgD-positive immunofluorescence was also detected in cardiomyocytes, in the membrane and around and inside the nucleus. These observations are in keeping with previous functional studies and unmasked new targets for exploring the biological relevance of alamandine/MrgD.



Número do Trabalho - P270

Impacto prognóstico da rigidez aórtica em pacientes com hipertensão resistente

AUTOR(ES): MUXFELDT ES; RODERJAN CN; SOUZA F; SALLES GFCM;

INSTITUIÇÃO: Hospital Universitário Clementino Fraga Filho - Universidade Federal do Rio de Janeiro

Introdução: O aumento da rigidez aórtica, medida pelo método padrão ouro, a velocidade da onda de pulso carótida-femoral (VOPcf), tem sido demonstrado ser um marcador de risco cardiovascular em pacientes com hipertensão, diabetes e na população geral. No entanto, sua importância prognóstica em pacientes com hipertensão resistente ainda não foi avaliada. **Métodos:** Em um estudo prospectivo, 835 pacientes com hipertensão resistente tiveram a VOPcf mensurada entre os anos de 2006 e 2008 e foram reavaliados até 2013. Todos tinham monitorização ambulatorial da pressão arterial (MAPA) realizada no mesmo mês da aferição da VOPcf. Os desfechos primários foram a ocorrência do primeiro evento cardiovascular (ECV) fatal ou não fatal, ECV maiores (infarto do miocárdio não fatal e acidente vascular encefálico somados a mortes por evento cardiovascular), mortalidade global e cardiovascular. A análise de sobrevida pelo modelo de Cox avaliou as associações entre a VOPcf (como uma variável contínua e dicotomizada em 10m/s) e seus desfechos. **Resultados:** A média da VOPcf foi de 9.1 (DP: 1.9) m/s, 209 pacientes (25%) tiveram VOPcf >10m/s. Após uma mediana de seguimento de 77 meses, ocorreram 113 primeiros ECV (102 ECV maiores), e 108 pacientes morreram, 67 de doenças cardiovasculares. Após ajuste para idade e sexo, a VOPcf contínua (aumento de 1m/s) foi preditora de todos os desfechos com uma razão de chance (RC) entre 1.11 e 1.13 (95%IC: 1.01-1.25, $p < 0.05$ para todos). No entanto, após ajuste para outros fatores de risco cardiovascular, incluindo PA sistólica da MAPA, a RC foi atenuada tornando-se não significativa (1.05 to 1.09; 95%IC: 0.96-1.22, todos com $p > 0.10$). Com a VOPcf dicotomizada, ajustada para idade e sexo, ela somente predisse a mortalidade global (RC: 1.57; 95%IC: 1.05-2.36); perdendo significância após ajuste estatístico completo. **Conclusões:** O aumento da rigidez aórtica não é um marcador de risco de prognóstico cardiovascular adverso em pacientes com hipertensão resistente. Sua performance foi atenuada após ajuste para outros fatores de risco cardiovasculares.



Número do Trabalho - P341

WALKING TRAINING IMPROVES CARDIOVASCULAR FUNCTION AND AUTONOMIC REGULATION IN PATIENTS WITH INTERMITTENT CLAUDICATION: A RANDOMIZED CONTROLLED TRIAL

AUTOR(ES): **Chehuen MR;** Cucato GG; Costa LAR; Ritti-Dias RM; Leicht AS; Carvalho CRF; Wolosker N; Forjaz CLM;

INSTITUIÇÃO: SCHOOL OF PHYSICAL EDUCATION AND SPORT, UNIVERSITY OF SÃO PAULO, SÃO PAULO , BRAZIL.

Introduction: Walking training (WT) has been recommended for the treatment of patients with intermittent claudication (IC) as it improves walking capacity. Moreover, WT should be able to promote changes on cardiovascular function and autonomic regulation, because cardiovascular causes are the main cause of mortality in these patients. However, the effect of WT on cardiovascular system in this population is little and needs more information. **Objectives:** To assess the effect of WT on cardiovascular function and autonomic regulation in patients with IC. **Methods:** Forty-two patients with IC were randomly assigned to 2 groups: Control (CG, n=20) and WT (n=22). Patients undertook 30 min classes of stretching (CG) or moderate intensity interval walking (WT- 15 sets of 2 min walking:2 min rest), twice/week for 12 weeks. Walking capacity (claudication onset distance, COD and total walking distance, TWD), blood pressure (BP, auscultatory method), cardiac output (CO, CO₂ rebreathing), heart rate (HR, ECG), stroke volume (SV), rate pressure product (RPP), systemic vascular resistance (SVR), forearm and leg vascular resistance (VR, venous occlusion plethysmography of mercury), low- (LF) and high-frequency (HF) components of HR variability (spectral analysis) and spontaneous baroreflex sensitivity (SBS, sequential method) were assessed prior to and following the study period. Significant changes (P<0.05) over time and between groups were assessed by 2-way ANOVA for repeated measures. **Results:** WT significantly increased COD (8;=94±44 m), TWD (8;=302±85 m) and decreased mean BP (8;=-5±2mmHg), CO (8;=-0.37±0.24 L/min), HR (8;=-4±2bpm) and RPP (8;=-1056±408mmHg/bpm). SV (8;=-5±6 ml), SVR (8;=0.91±0.26 U) and leg VR (8;=0.0±10.5 U) were unchanged following WT, and forearm VR (8;=-8.5±2.8 U) decreased significantly. LF/HF ratio (8;=-1.24±0.99) was significantly reduced and SBS (8;=2.13±1.07 ms/mmHg) increased after WT. No significant changes were noted for the CG. **Conclusions:** As expected, WT improved walking capacity (COD and TWD). Moreover, WT enhances cardiovascular function (BP, CO, HR, RPP, forearm VR) and autonomic regulation (LF/HF, SBS) in patients with IC. These changes provide further support for the benefits of regular WT in treating of patients with IC. **Financial Support:** FAPESP; CNPq; CAPES; CAPES-PROEX.



Número do Trabalho - P264

ÍNDICE TORNOZELO-BRAQUIAL COMO PREDITOR DE ESTENOSE GRAVE EM ARTÉRIA RENAL

AUTOR(ES): Macedo TA; Brito TM; Poppi NT; Pedrosa RP; Costa-Hong V; Kajita LJ; Silva PGMB; Lima JJG; Drager LF; Bortolotto LA;

INSTITUIÇÃO: INSTITUTO DO CORAÇÃO (INCOR) - HC FMUSP

INTRODUÇÃO: A estenose de artéria renal (EAR) está associada a lesões em outros territórios vasculares e a identificação dos pacientes com EAR pode incluir marcadores clínicos e laboratoriais de aterosclerose, como a presença de doença arterial periférica (DAP). **OBJETIVOS:** Determinar os preditores de EAR significativa ($\geq 70\%$) em pacientes hipertensos com indicação de arteriografia renal por suspeita clínica de hipertensão renovascular (HRV). **CASUÍSTICA E MÉTODOS:** Foram incluídos 82 pacientes hipertensos, sob suspeita clínica de HRV, cuja investigação complementar (Doppler, angiorressonância e/ou cintilografia renal) indicou a possibilidade de EAR. Todos os pacientes foram submetidos à arteriografia renal e estenose significativa foi definida por obstrução luminal maior ou igual a 70%. As variáveis clínicas e de exame complementar foram consideradas na análise univariada para correlação com a presença de EAR $\geq 70\%$. Todos os pacientes foram submetidos à avaliação de presença de DAP pela medida do índice tornozelo-braquial (ITB) [DAP = ITB < 0.9]. As variáveis com associação significativa foram elegíveis ao modelo multivariado, por regressão linear simples e análise de regressão múltipla. **RESULTADOS:** A idade média foi 59 ± 13 anos e predomínio do sexo feminino (66%). A pressão sistólica média foi 145 ± 28 mmHg e o número médio de anti-hipertensivos foi 4 (3-5). Dentre os fatores de risco para doença cardiovascular: diabetes mellitus (44%), tabagismo (32%), doença cerebrovascular prévia (26%) e claudicação intermitente (35%). O LDL médio foi 110 ± 35 mg/dl e 70% dos pacientes estavam em uso de estatina. EAR $\geq 70\%$ foi encontrada em 39% dos pacientes e foi mais prevalente em pacientes com idade mais avançada (média 63 ± 12 anos; $p < 0.01$). O valor de ITB $< 0,9$ (29%) esteve fortemente associado (OR: 3,11, IC 95% 1,16 – 8,32; $p = 0,02$) à presença de EAR $\geq 70\%$. **CONCLUSÕES:** A presença de DAP por ITB < 0.9 é um bom preditor de estenose grave em artéria renal em pacientes sob suspeita clínica de hipertensão renovascular, principalmente em pacientes com idade mais avançada.