

**PARTICIPAÇÃO DA VIA DE SINALIZAÇÃO DA PROTEÍNA CINASE D (PKD1)
SOBRE A REGULAÇÃO DA REATIVIDADE VASCULAR E A FUNÇÃO DO
CARDIOMIÓCITO VENTRICULAR**

Bruno Barcellos Jacobsen

Tese de Doutorado em Ciências Fisiológicas

**Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas
Universidade Federal do Espírito Santo**

Vitória-ES, 30 de Abril de 2020

UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO
Centro de Ciências da Saúde
Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas

**REGISTRO DE JULGAMENTO DA DEFESA DE TESE DO CANDIDATO AO TÍTULO
DE DOUTOR PELO PPGCF/CCS/UFES**

Nº. Matrícula do Candidato: 2015

A comissão julgadora que examinou a tese de doutorado, intitulada "PARTICIPAÇÃO DA VIA DE SINALIZAÇÃO DA PROTEÍNA CINASE D (PKD1) SOBRE A REGULAÇÃO DA REATIVIDADE VASCULAR E A FUNÇÃO DO CARDIOMIÓCITO VENTRICULAR", apresentada e defendida publicamente pelo aluno Bruno Barcellos Jacobsen, no dia 30 de Abril de 2020, às 13:30 horas, decidiu, por unanimidade, aprovar a referida tese de doutorado e, portanto, declara que o aluno faz jus à obtenção do título de Doutor em Ciências Fisiológicas.

Vitória-ES, 30 de abril de 2020

Prof Dr Henrique de Azevedo Futuro Neto (EMESCAM)

Profa Dr^a Aurélio Araújo Fernandes (PPGBF-UFES)

Profa Dr^a. Alessandra S. Padilha (PPGCF-UFES)

Profa Dr^a Silvana dos Santos Meyrelles (PPGCF-UFES)

Prof^a. Dr^a. Ivanita Stefanon - Orientadora (PPGCF-UFES)

Profa Dr^a Julie Bossuyt (Department of Pharmacology- UC Davis) - Co-orientadora

UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO**Vitória-ES, 30 de abril de 2020**

Jacobsen, Bruno Barcellos Jacobsen, 1985

“PARTICIPAÇÃO DA VIA DE SINALIZAÇÃO DA PROTEÍNA CINASE D (PKD1) SOBRE A REGULAÇÃO DA REATIVIDADE VASCULAR E A FUNÇÃO DO CARDIOMIÓCITO VENTRICULAR”. Vitória – 2020. xxii, (inserir número de páginas) p., (UFES, D.Sc., Ciências Fisiológicas, 2020)

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Ivanita Stefanon. Tese (Doutorado) - Universidade Federal do Espírito Santo. Centro de Ciências da Saúde. Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas. 1. Proteína Kinase D (PKD); 2. Sinalização Intracelular em cardiomiócitos; 3. Reatividade Vascular; 4. Transiente de Cálcio; 5. Endotélio vascular; 6. SHR; 7. Angiotensina II; 8. Fenilefrina

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho às pessoas mais importantes da minha vida e as que entraram nela nesse momento tão especial,

Aos meus Pais...

Que mesmo vindo do campo para a cidade com muitas dificuldades, me deram a oportunidade de seguir em frente com meus estudos e representam minhas raízes, minha base e fé. Minha mãe, por me carregar no colo e me acolher com suas orações nos momentos mais difíceis da minha vida e por sempre estar do meu lado pra tudo, principalmente durante minha saída para o doutorado sanduiche, onde só recebia suas ligações... Ao meu pai, toda admiração do mundo por dias incansáveis de trabalho para dar oportunidade para eu e meu irmão estudar, algo que não foi possível na sua juventude. Então, como forma de agradecimento, meus esforços para chegar no ponto mais alto da vida acadêmica. Com eles aprendi a ser digno e a ter força de vontade para o trabalho honesto, contribuindo assim, para meu crescimento e caráter. Amor, admiração e gratidão eterna!

Ao meu irmão Octávio...

Imenso orgulho e admiração por você. Exemplo de vida a ser seguido e reproduzido como profissional (Cirurgião Vascular). Meu espelho!

Aos meus amigos...

Obrigado pelos constantes incentivos e torcida pelo meu futuro. Vocês são essenciais!

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

A minha orientadora, *Prof. Dra. Ivanita Stefanon*, que desde a primeira aula de fisiologia cardíaca me encantou por sua forma paciente, clara e amor pela docência. Agradeço sempre a Deus e a ela por ter me aceitado nessa etapa da minha vida chamada "tese". Excelente pessoa ao qual sempre terei eterna gratidão, respeito e admiração. Imenso orgulho de ser seu orientando e de poder ter esse exemplo de comprometimento e respeito pela docência e pesquisa. Muito obrigado pela confiança e oportunidade de aprendizado. Obrigado também, pela oportunidade de chegar no ponto mais alto da minha vida acadêmica, por ter me dado a oportunidade de morar e ter uma educação em um país de primeiro mundo. Sem você nada disso seria possível! De fato, minha vida na UC Davis, Califórnia, fez um diferencial na minha educação. Minha eterna gratidão!

A minha Co-orientadora, *Prof. Dra. Julie Bossuyt*, por ter me acolhido tão bem no laboratório, fazendo me sentir confortável no meu ambiente de trabalho, por ter me ensinando técnicas de biologia molecular, as quais, precisei fosforilar alguns neurônios para compreender. Foram inúmeros meses de trabalho contínuo, sem finais de semana, mas que valeram cada segundo estar ao seu lado e poder absorver um pouco de seu conhecimento tão grande. Minha eterna gratidão!

Ao Dr Donald Bers, por ter me aceitado no seu grupo. Sem explicações poder estar diante de pesquisadores com nível tão alto de conhecimento. Jamais vou me esquecer das ricas discussões de trabalhos realizados nas segundas feiras as 8 am.

AGRADECIMENTOS

Essas pessoas me proporcionaram dias melhores e mais felizes dentro da pesquisa por suas amizades, carinho e brincadeiras. A pesquisa jamais seria a mesma coisa sem vocês. Muito obrigado pela cooperação, colaboração e a oportunidade do convívio. Vocês fizeram muita diferença. O trabalho foi pesado, mas, com ajuda de vocês tudo ficou mais agradável.

Aos amigos de laboratório em especial Vinícius Bermond, Maylla Ronacher, Antônio Jr vulgo coala, Edgar, Marcos Leal e Pollyana Peixoto. Obrigado pelos bons conselhos e pelos "bons dias" dado no corredor com semblantes sempre amigáveis e verdadeiros. Vocês são pessoas contagiantes além de ótimos pesquisadores.

Ao professor Patrick Endlich por ter apresentado ao PPGCF. E feita as primeiras indagações sobre o que é ser pesquisador.

Aos amigos da UC DAVIS na Califórnia, em especial Mitch e Chris por terem sido meus anjos da guarda não só com a pesquisa, mas também pela paciência que vocês tiveram em me ensinar tudo que precisei. Por estarem sempre disponíveis as minhas dúvidas. Não tenho palavras para dizer o quanto vocês foram importantes nesse processo. Gratidão eterna!

Aos meus colegas do Laboratório do Dr Bers e Dra Julie na UCDavis, Logan e Johana pelo suporte técnico no isolamento dos cardiomiócitos. A Maura pela preparação dos adenovírus para o processo de transfecção das células. O meu agradecimento. BIG THANKS!

Aos demais colegas Caatherine, Natalie, Rogério, Sônia, Bence, Maura, Pim, Marie, Kem, Niket, Ana, Sabine, Elena, Brittany meu eterno agradecimento por passarem na minha vida e ter deixado boas memórias.

Aos amigos que fiz na Califórnia durante o doutorado sanduiche: Lucas, Mário, Luiz, Luis, Duka, Thiago, Fernanda, Josuel, Alessandra, Johan, Jessica, Phil, Amanda, Bruna. Obrigado por serem minha família nesse período. Jamais esquecerei vocês.

Aos professores *Dr. José Geraldo Mill* e *Dra. Nazaré Bissoli* pelas críticas e sugestões durante o exame de qualificação, que contribuíram para o aprimoramento deste trabalho.

A todos meus *AMIGOS* dos quais estive longe neste período, porém sempre com vocês no coração, nos pensamentos e nas histórias contadas. Sem o apoio de vocês este sonho teria sido muito difícil – Wilcley, João, Gustavo, Alex, Diego, Otávio, Fernanda, Bianca, Marinaldo, Altair, Welton, Artur e a minha prima-amiga Paula Bullerjhann. Obrigado por todo apoio e incentivo.

A minha namorada linda, que chegou trazendo paz na minha vida. Ensinando-me que as coisas tem o tempo certo para acontecer. Ajudando-me principalmente nesse período final onde o estresse toma conta dos outros sentimentos. Obrigado por me aguentar e por cuidar de mim com tanto carinho. Você é uma pessoa muito especial!

A banca composta pelos examinadores: Prof Dr Henrique de Azevedo Futuro Neto, Profa Dr^a Aurélia Araújo Fernandes, Profa Dr^a. Alessandra S. Padilha, Profa Dr^a Silvana dos Santos Meyrelles. Meu sincero agradecimento por aceitarem ler o trabalho e contribuir cientificamente com a minha formação e em especial, por compreender a entrega da tese em tempo reduzido.

Ao Colegiado Acadêmico do Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas (PPGCG-UFES), por entender meu atraso na defesa e ceder mais tempo para a finalização dos experimentos e escrita da tese.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (**CAPES**), pela bolsa de doutorado por um período de 48 meses, incluindo a bolsa de doutorado sandwich no exterior, realizado no Laboratório do Dr. Donald Bers e da Dra Julie Bossuyt, no *Department of Pharmacology - Genome and Biomedical Sciences Facility*, UC DAVIS, CA-USA.

À Fundação de Amparo à Pesquisa e Inovação do Espírito Santo (Processo 84324600/2018 - **FAPES**), pelo apoio financeiro para este projeto de pesquisa e também para a apresentação de parte dos dados deste estudo, no *“Cardiovascular Symposium 2020*, ocorrido em fevereiro de 2020, na Califórnia -UC DAVIS. Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (**CNPq**), pelo apoio financeiro a este projeto de pesquisa.

EPIGRAFE

***“...É PRECISO DORMIR PARA SONHAR, E
ACORDAR PARA REALIZAR OS SONHOS...”***

Ivanita Stefanon

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	24
1.1 Célula Cardíaca e a função da Proteína Cinase D (PKD).....	24
1.2 Isoformas da PKD.....	25
1.3 Músculo Liso Vascular.....	29
1.4 Receptores α -Adrenérgicos Vascular.....	30
1.5 Receptores para Angiotensina II.....	30
1.6 Endotélio vascular.....	32
1.7 Modelo Experimental para estudo da Hipertensão Arterial: SHR.....	35
1.8 Fisiologia dos vasos sanguíneos.....	36
1.9 Justificativa do Estudo.....	38
2. OBJETIVOS	39
3. MATERIAL E MÉTODOS	40
3.1 Estudo Funcional em Cardiomiócitos Ventriculares Isolados.....	40
3.2 Animais Experimentais Parte I.....	40
3.3 Isolamento de miócitos ventriculares de coelho.....	40
3.4 Medidas de transferência de energia através da ressonância de fluorescência confocal e de fluorescência da sinalização de PKD – FRET.....	41
3.5 Medidas confocais de espaço-tempo da translocação PKD.....	41
3.6 Medida indireta da atividade da PKD por meio da técnica: FRET DKAR.....	42
3.7 Cardiócitos ventriculares de camundongos.....	42
3.8 Imagem confocal do transiente de cálcio e dos sparks em miócitos de camundongos ventriculares intactos.....	43
3.9 Estudo da Função Vascular.....	44
3.9.1 Animais Experimentais Parte II.....	44
3.9.2 Pletismografia de Cauda.....	45

3.9.4	Reatividade Vascular em Anéis de Aorta Torácica.....	45
3.9.4	Protocolos experimentais.....	50
3.9.5	Resposta vasodilatadora dependente e independente do endotélio.....	50
3.9.5	Resposta vasoconstritora à fenilefrina.....	50
3.9.7	Modulação da reatividade vascular induzida pela angiotensina II.....	51
4.	ANÁLISES ESTATÍSTICA.....	51
5.	RESULTADOS.....	52
5.1	Sinalização da via PKD1 no núcleo, citoplasma, mitocôndria em cardiomiócitos ventriculares de coelhos.....	52
5.2	Avaliação do transiente de cálcio em miócitos ventriculares de camundongos de linhagem C56BL6 em condição basal, em células PKD WT vs PKD KO.....	52
5.3	Avaliação do transiente de cálcio em miócitos ventriculares de camundongos de linhagem C56BL6 com e sem a utilização da angiotensina II em células PKD WT vs PKD KO.....	54
5.4	Avaliação do Transiente de Cálcio em miócitos ventriculares de camundongos de linhagem C56BL6 com e sem a utilização da aldosterona em células PKD WT vs PKD KO.....	57
5.5	Avaliação do Percentual de encurtamento em cardiomiócitos PKD WT vs PKD KO e do retículo através do uso de cafeína.....	60
5.6	Dados gerais dos animais Wistar vs SHR.....	62
5.7	Reatividade a fenilefrina em anéis isolados de aorta em animais normotensos versus SHR na presença e ausência do bloqueador da PKD (CID).....	62
5.8	Reatividade vascular em anéis isolados de aorta em animais normotensos e SHR, com e sem a atuação do bloqueador da PKD (CID): Curva concentração resposta à angiotensina II.....	69
6.	DISCUSSÃO.....	76

6.1 Papel da modulação da sinalização da PKD sobre a função de cardiomiócitos ventriculares.....	76
6.2 Reatividade vascular estudada em anéis de aorta torácica de ratos Wistar e SHR: papel da modulação da sinalização da PKD.....	77
6.3 Reatividade vascular durante ativação de receptor α -adrenérgico.....	78
6.4 Reatividade Vascular a Angiotensina II.....	83
6.5 Resumo dos principais achados do estudo da reatividade vascular.....	87
6.5.1 Resposta via Receptor alfa.....	87
6.5.2 Resposta mediada pela angiotensina II.....	88
7. Conclusão.....	88
8. Referências.....	89

LISTA DE TABELA

Tabela 1. Características gerais.....	62
--	----

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Funções do microdomínio da Proteína Cinase D (PKD) no cardiomiócito. Na figura acima, podemos observar a atuação da PKD em diferentes regiões da célula cardíaca (sarcolema, citosol, núcleo, mitocôndria, complexo de golgi.....26
- Figura 2.** Via de sinalização da PKD a jusante pela aldosterona e angiotensina II na célula cardíaca (modificada).....28
- Figura 3.** As células endoteliais dependendo do estímulo recebido, liberam fatores que levam à contração ou relaxamento no músculo liso vascular. Fatores vasodilatadores {Óxido nítrico (NO), fator hiperpolarizante derivado do endotélio (EDHF) prostaciclina (PGI₂)} produzidos pelo endotélio, que ao atuarem no músculo liso vascular (MLV) ocasionam na diminuição de Ca²⁺ intracelular levando a vasodilatação. Fatores vasoconstritores {endotelina-1 (ET-1) Angiotensina II (Angio II); prostaglandinas H₂ (PGH₂); tromboxano A₂ (TXA₂); peroxinitrito (OONO⁻); ânion superóxido (O₂^{•-}); e radical hidroxila (HO.)} também produzidos pelo endotélio, responsáveis pelo aumento de Ca²⁺ no citoplasma da célula do musculo liso vascular ocasionando na vasoconstrição.....33
- Figura 4.** Síntese, liberação e ação do NO e o papel da eNOS na sua produção. O óxido nítrico como o produto da reação de oxiredução da L-arginina quando liberado, difunde-se rapidamente da célula geradora para as células endoteliais para a musculatura lisa do vaso sanguíneo. Na célula muscular lisa, o NO ativa uma enzima catalítica, a guanilato ciclase solúvel (GCs) que por sua vez irá formar o monofosfato de guanosina cíclico (GMPc), a partir da quebra do trifosfato de guanosina (GTP). A formação do GMPc promove o acionamento da bomba de cálcio dentro da célula muscular lisa, diminuindo as concentrações de cálcio intracelular levando a diminuição do tônus vascular (modificada).....34

Figura 5. Isoformas da Óxido Nítrico Sintase. Pode ser observado que as isoformas constitutivas são dependentes de Ca^{2+} e geradas a partir do processo fisiológico e que a isoforma induzível provocada por um processo patológico como por exemplo um processo inflamatório.....35

Figura 6. A figura acima mostra a categorização de artérias em relação ao remodelamento arterial. (A) O remodelamento vascular pode modificar as secções transversais dos vasos sanguíneos, podendo ser hipertrófico (maior área da camada média; eutrófico (sem mudanças na área da camada média; ou hipotrófico (menor área da camada média. Essas formas de remodelamento podem ser: interna (redução do diâmetro interno) ou externa (aumento do diâmetro interno). (B) Estrutura das camadas arteriais (adaptado de Carretero et al, 2005).....38

Figura 7. (A) Aorta torácica imersa em uma placa de Petri contendo solução de Krebs e tecido conectivo e adiposo; (B) Após a retirada dos tecidos e sendo dividida em segmentos cilíndricos de aproximadamente 4 mm.....47

Figura 8. Esquema ilustrativo da preparação dos anéis de aorta para a avaliação da reatividade vascular (in vitro). Em A temos o amplificador utilizado para aumentar um sinal elétrico recebido; B - sistema Biopac para análise de dados flexível e eficiente na área da pesquisa; C – computador, aonde são armazenado os dados; D - anel de aorta limpo de tecido conectivo e adiposo com aproximadamente 4mm; E - cuba contendo mistura carbogênica (5% de CO_2 e 95% O_2), solução de Krebs modificada conforme descrito acima, haste metálica para tensionar a artéria e na letra F, transdutor de força utilizado para medir a tensão exercida no tecido (Modificado de Nunes, 2014).....48

Figura 9. Esquema com registro de curvas, representando o teste da viabilidade do músculo liso vascular com KCl e avaliação da integridade funcional do endotélio. Avaliação da viabilidade do músculo liso vascular com KCl: A) Período de estabilização inicial (45 min permanecendo na tensão de $1 \pm 0,1$ gramas); B) Adição de 125 μ l de KCl a uma concentração de 75 mM no banho; C) Lavagem dos anéis por 3 vezes com solução Krebs-Henseleit; D) Período de estabilização (30 min); E) Adição de 125 μ l de KCl a uma

concentração de 75 mM no banho; F) Platô da contração induzida pelo KCl (75 mM); G) Lavagem dos anéis com solução Krebs-Henseleit; H) Período de estabilização (30 min). Avaliação da integridade funcional do endotélio: I) Pré-contracção com fenilefrina (Fe) 10^{-7} M; J) Platô da contração induzida pela Fe; L) Adição de acetilcolina (ACh) 10^{-5} M. O tempo foi registrado em minutos, eixo horizontal (intervalo de 80 min) e a força em gramas (g), eixo vertical. (Dias, 2007).....49

Figura 10. Medida, em tempo real, da atividade da PKD1 no núcleo, citoplasma e mitocôndria dos cardiomiócitos. Foi utilizado como forma de tratamento agudo: angiotensina II, androsterona e salina, *p <0,05 versus controle.....52

Figura 11. Mensuração simultânea do cálcio no cardiomiócito entre o núcleo (linha vermelha) e o citosol (linha preta) em situação basal e avaliação do transiente de cálcio nos parâmetros: Amplitude do transiente de cálcio, TTP (tempo para o pico, ms) e CaTD50 (tempo de decaimento em 50 % do pico, ms) para os camundongos PKD WT (Wildtype) e PKD KO (*Knockout* para PKD1).....53

Figura 12. Avaliação do transiente de cálcio antes (Controle) e após incubação com angiotensina II registrados no núcleo e citosol dos cardiomiócitos isolados, com a membrana celular intacta e estimulados com eletrodos de platina a uma frequência de 0,5 Hz. Avaliação da amplitude do transiente de cálcio, TTP e CaTD50, nos grupos WT (Wistar), KO (Knockout para PKD1). Comparação entre o citosol e o núcleo dos cardiomiócitos ventriculares de camundongos. ns (diferença não significativa), teste t de Student, As análises estatísticas estão indicadas nas figuras.....55-56

Figura 13. Avaliação do transiente de cálcio antes (Controle) e após incubação com Aldosterona registrados no núcleo e citosol dos cardiomiócitos isolados, com a membrana celular intacta e estimulados com eletrodos de platina a uma frequência de 0,5 Hz. Avaliação da amplitude do transiente de cálcio, TTP e CaTD50, nos grupos WT (Wistar), KO (Knockout para PKD1). Comparação entre o citosol e o núcleo dos cardiomiócitos ventriculares de camundongos. ns

(diferença não significativa), teste t de Student, As análises estatísticas estão indicadas nas figuras58-59

Figura 14. Percentual de encurtamento PKD WT vs PKD KO total. A) Sem tratamento; B) Aldosterona; C) Angiotensina II; D) Estímulo Beta-adrenérgico com isoproterenol e E) Cafeína para avaliação da extrusão do cálcio do retículo sarcoplasmático (RS).....60-61

Figura 15. Atuação da PKD sobre a reatividade vascular em aortas. Curva concentração resposta à fenilefrina nos grupos Wistar e SHR. Os dados são expressos como média \pm SEM. ANOVA one way, post hoc Tukey (** $p < 0,01$). Os números de anéis de aorta estão indicado entre parênteses.....63

Figura 16. Atuação da PKD sobre a reatividade vascular em aortas. Curva concentração resposta à fenilefrina e modulação endotelial. Ausência do endotélio (E-). Os dados são expressos como média \pm SEM. ANOVA one way, post hoc Tukey (* $p < 0,05$ e ** $p < 0,01$). Os números de anéis de aorta estão indicados entre parênteses.....64

Figura 17. Efeitos da inibição da PKD e da via do NO sobre a reatividade vascular na curva de contração de fenilefrina em anéis de aortas utilizando CID e L-NAME. Os dados são expressos como média \pm SEM. ANOVA one way, post hoc Tukey (* $p < 0,05$ e ** $p < 0,01$). Os números de anéis de aorta estão indicados entre parênteses.....65

Figura 18. Atuação da PKD sobre a reatividade vascular em aortas. Curva concentração resposta à fenilefrina e modulação endotelial utilizando o inibidor nNOS. Os dados são expressos em (* $p < 0,05$ e ** $p < 0,01$) Os números de anéis de aorta estão entre parênteses.....66

Figura 19. Atuação da PKD sobre a reatividade vascular em aortas. Curva concentração resposta à fenilefrina e modulação endotelial utilizando o inibidor nNOS, sem endotélio (E-) e com endotélio preservado (E+). Os dados são expressos em (** $p < 0,01$) Os números de anéis de aorta estão indicados entre parênteses.....67

Figura 20. Participação da PKD sobre a reatividade vascular em anéis isolados de aorta. Curva concentração resposta à fenilefrina e modulação endotelial utilizando o inibidor específico da iNOS, composto 1400 W (I iNOS) na presença e ausência do inibidor da PKD (CID). Os dados são expressos como média \pm SEM. ANOVA one way, post hoc Tukey (* $p < 0,05$ e ** $p < 0,01$,). Os números de anéis de aorta estão indicado entre parênteses.....68

Figura 21. Participação da PKD sobre a reatividade vascular em anéis isolados de aorta com e sem (E-) endotélio vascular. Curva concentração resposta à fenilefrina e modulação endotelial utilizando o inibidor específico da iNOS, composto 1400 W (I iNOS) na presença e ausência do inibidor da PKD (CID). Os dados são expressos como média \pm SEM. ANOVA one way, post hoc Tukey (* $p < 0,05$ e ** $p < 0,01$,). Os números de anéis de aorta estão indicados entre parênteses.....69

Figura 22. Participação da PKD sobre a reatividade vascular em anéis isolados de aorta. Curva concentração resposta à Angiotensina II na presença e ausência do inibidor da PKD (CID). Os dados são expressos como média \pm SEM. ANOVA one way, post hoc Tukey (* $p < 0,05$). Os números de anéis de aorta estão indicados entre parênteses.....70

Figura 23. Participação da PKD sobre a reatividade vascular em anéis isolados de aorta, na presença e ausência do endotélio vascular (E-). Curva concentração resposta à Angiotensina II na presença e ausência do inibidor da PKD (CID). Os dados são expressos como média \pm SEM. ANOVA one way, post hoc Tukey (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$). Os números de anéis de aorta estão indicados entre parênteses.....71

Figura 24. Participação da PKD sobre a reatividade vascular em anéis isolados de aorta, na presença e ausência da inibição da síntese de NO, pelo L-NAME (LN). Curva concentração resposta à Angiotensina II na presença e ausência do inibidor da PKD (CID). Os dados são expressos como média \pm SEM. ANOVA one way, post hoc Tukey (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$). Os números de anéis de aorta estão indicados entre parênteses.....72

Figura 25. Participação da PKD sobre a reatividade vascular em anéis isolados de aorta, na presença e ausência da inibição da síntese de NO, pelo inibidor da nNOS (I nNOS). Curva concentração resposta à Angiotensina II na presença e ausência do inibidor da PKD (CID). Os dados são expressos como média \pm SEM. ANOVA one way, post hoc Tukey (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$). Os números de anéis de aorta estão indicados entre parênteses.....73

Figura 26. Participação da PKD sobre a reatividade vascular em anéis isolados de aorta, na presença e ausência da inibição da síntese de NO, pelo inibidor da iNOS (I iNOS). Curva concentração resposta à Angiotensina II na presença e ausência do inibidor da PKD (CID). Os dados são expressos como média \pm SEM. ANOVA one way, post hoc Tukey (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$). Os números de anéis de aorta estão indicados entre parênteses.....74

Figura 27. Participação da PKD sobre a reatividade vascular em anéis isolados de aorta, na presença e ausência da inibição da síntese de NO, pelo inibidor da iNOS (I iNOS), na presença e na ausência do endotélio vascular (E-). Curva concentração resposta à Angiotensina II na presença e ausência do inibidor da PKD (CID). Os dados são expressos como média \pm SEM. ANOVA one way, post hoc Tukey (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$). Os números de anéis de aorta estão indicados entre parênteses.....75

RESUMO

Os hormônios e neurotransmissores do sistema renina angiotensina aldosterona (SRAA) e do sistema nervoso autônomo (SNA) podem atuar nos vasos e coração, modulando diversas vias de sinalização intracelular. Muito embora as vias de sinalização das enzimas PKA e PKC sejam mais bem estudadas e conhecidas, a via de sinalização da PKD tem sido pouco estudada até o momento. A PKD é uma enzima da família de serina/treonina-quinases compreendendo três isoformas de PKD homólogas (PKD1/PKC μ , PKD2 e PKD3/PKC ν) e pertence à superfamília da Ca²⁺-calmodulina dependente de proteína cinase (CaMK). A isoforma PKD1 é cada vez mais reconhecida como um regulador chave de uma série complexa de processos fisiológicos fundamentais, incluindo: transdução de sinal, proliferação e diferenciação celular, transporte através da membrana, secreção, expressão gênica, utilização de substrato, e regulação da contratilidade miocárdica. Entretanto, pouco se sabe sobre a atuação da PKD1 sobre a reatividade vascular e regulação de cardiomiócitos. **Estudo dos Cardiomiócitos** - Estudo funcional realizado em cardiomiócitos ventriculares isolados de coelhos brancos da Nova Zelândia foram transfectados por adenovírus denominados de Repórteres Ativadores de Cinase D (DKARs) que mede a atividade da PKD em diferentes locais dos cardiomiócitos (citoplasma, núcleo e mitocôndria). Os DKARs no núcleo apresentaram valores mais elevados ao tratamento feito pela aldosterona, ao passo que quando, analisamos o citoplasma e a mitocôndria, foi observada atuação da angiotensina II de forma mais significativa. Já para análise do transiente de cálcio e contratilidade, foram utilizados cardiomiócitos ventriculares de camundongos de linhagem C56BL6, divididos nos grupos: selvagem WT e PKD1 KO (knockout) cardíaco-específicos. O principal resultado foi um aumento a resposta a angiotensina II nas células dos animais PKD WT quando comparado às células sem tratamento ($p=0,0049$) no citosol. O percentual de encurtamento de cardiomiócitos não foi diferente entre os grupos, nem na presença dos fármacos (angiotensina II, aldosterona e isoproterenol). **Estudo da Função Vascular** – Foi utilizado ratos Wistar (*normotensos*) e Wistar espontaneamente hipertensos (SHR). Para avaliar se a diferença da pressão arterial sistólica (PAS) existia, foi feita aferição através do método de pletismografia de cauda (PAS Wistar $125,8 \pm 1,2$ mmHg e SHR= $204,8 \pm 4,0^*$ mmHg, $p < 0,01$). A reatividade vascular foi estudada usando anéis isolados de aorta torácica para avaliação da contração ao estímulo α -adrenérgico (curva concentração resposta a Fenilefrina (10^{-10} a $3,5 \times 10^{-3}$ M) e da ativação de receptores AT, usando angiotensina II (10^{-10} a 10^{-5} M), na presença e ausência: endotélio vascular; CID 3,2 μ M – um inibidor seletivo e específico da PKD1; L-NAME 100 μ M,

um inibidor não-seletivo da enzima óxido nítrico sintase (NOS); o composto 1400W 1 μ M, um potente inibidor e altamente seletivo da iNOS; N- ω -cloridrato-propil-L-arginina 0,5 μ M, um inibidor potente e seletivo da nNOS. No grupo Wistar, a resposta contrátil as doses crescentes de fenilefrina não foram modificadas quando a PKD foi inibida com o CID. No grupo SHR, podemos identificar uma redução da resposta contrátil na presença de CID (Fenilefrina $10^{-3,5}$ M; CT = $116,6 \pm 13,5$ vs CID $60 \pm 14,6$ %, $p < 0,05$). Estes dados sugerem a participação da via da PKD, na resposta contrátil induzida pela fenilefrina, no grupo SHR. A angiotensina II induziu resposta contrátil, de maneira concentração-dependente, nos anéis isolados de aorta de todos os grupos estudados. No grupo Wistar, a resposta contrátil a angiotensina II foi menor durante a incubação com CID, enquanto no grupo SHR, a inibição da PKD, não modificou a resposta contrátil a angiotensina II. No grupo Wistar, a inibição da iNOS, aumentou a resposta contrátil a angiotensina II quando a enzima PKD foi inibida, com o CID. No grupo SHR, podemos verificar que a contratilidade dependente de angiotensina II foi maior na presença do inibidor da iNOS, tanto na presença quanto na ausência da PKD. Estes dados sugerem que, no grupo SHR, a produção de NO, depende da enzima iNOS. Nos animais do grupo SHR, a inibição da nNOS elevou a resposta contrátil a angiotensina II. A inibição da via da PKD, reduziu o aumento da resposta contrátil a angiotensina II, durante a inibição da nNOS. Estes dados sugerem que, no grupo hipertenso, a via de síntese de NO, dependente da enzima nNOS, participa da resposta contrátil induzida pela angiotensina II. Em conclusão, o conjunto dos resultados obtidos neste estudo confirma nossa hipótese da participação da via de sinalização da PKD sobre a regulação aguda das funções de cardiomiócitos ventriculares e sobre a reatividade vascular. Em cardiomiócitos ventriculares, a aldosterona atuou diretamente na PKD nuclear juntamente com as HDACs, importantes reguladores no remodelamento cardíaco. Já no citosol e nas mitocôndrias, a angiotensina II ativou agudamente a via da PKD1. E em relação a reatividade vascular foi observado que nos animais hipertensos, este papel modulador da sinalização da via da PKD sobre as respostas vasculares mediadas pela angiotensina II e fenilefrina, depende da ativação de distintas isoformas da NOS, localizadas no músculo liso vascular e endotélio. No grupo hipertenso, a modulação, via PKD, parece depender mais da participação da nNOS, enquanto no grupo normotenso, das vias da eNOS e iNOS.

Palavras-chave: proteína quinase D, cardiomiócitos, transfecção, transiente de cálcio, contratilidade, reatividade vascular

ABSTRACT

The hormones and neurotransmitters of the renin angiotensin aldosterone system (RAAS) and the autonomic nervous system (ANS) can act on the vessels and heart, modulating several intracellular signaling pathways. Although the signaling pathways of the PKA and PKC enzymes are better studied and known, the signaling pathway of PKD has been little studied so far. PKD is an enzyme of the serine / threonine kinase family comprising three homologous PKD isoforms (PKD1 / PKC μ , PKD2 and PKD3 / PKC ν) and belongs to the Ca²⁺ protein kinase dependent (CaMK) superfamily. The PKD1 isoform is increasingly recognized as a key regulator of a complex series of fundamental physiological processes, including: signal transduction, cell proliferation and differentiation, membrane transport, secretion, gene expression, use of substrate, and regulation of contractility myocardial. However, little is known about the role of PKD1 on vascular reactivity and cardiomyocyte regulation. **Cardiomyocyte Study - Functional study** performed on ventricular cardiomyocytes isolated from white New Zealand rabbits were transfected by adenoviruses called Kinase Activating Reporters (DKARs) that measure PKD activity in different locations of the cardiomyocytes (cytoplasm, nucleus and mitochondria). The DKARs in the nucleus showed higher values for the treatment made by aldosterone, whereas when we analyzed the cytoplasm and mitochondria, the performance of angiotensin II was observed in a more significant way. For the analysis of the calcium transient and contractility, ventricular cardiomyocytes of C56BL6 mice were used, divided into groups: wild cardiac-specific WT and PKD1 KO (knockout). The main result was an increased response to angiotensin II in the cells of PKD WT animals when compared to cells without treatment ($p = 0.0049$) in the cytosol. The percentage of cardiomyocyte shortening was not different between groups, nor in the presence of drugs (angiotensin II, aldosterone and isoproterenol). **Study of Vascular Function - Wistar rats** (normotensive) and Wistar spontaneously hypertensive (SHR) were used. To assess whether the difference in systolic blood pressure (SBP) existed, measurement was performed using the tail plethysmography method (PAS Wistar 125.8 ± 1.2 mmHg and SHR = 204.8 ± 4.0 * mmHg, $p < 0.01$). Vascular reactivity was studied using isolated rings of the thoracic aorta to assess the contraction of the α -adrenergic stimulus (concentration curve response to Phenylephrine (10^{-10} to 3.5×10^{-3} M) and the activation of AT receptors, using angiotensin II (10^{-10} to 10^{-5} M), in the presence and absence: vascular endothelium; ICD $3.2 \mu\text{M}$ - a selective and specific inhibitor of PKD1; L-NAME $100 \mu\text{M}$, a non-selective inhibitor of the enzyme nitric oxide synthase (NOS); the compound 1400W $1 \mu\text{M}$, a potent and highly selective inhibitor of iNOS; N- ω -hydrochloride-propyl-L-arginine $0.5 \mu\text{M}$, a potent and selective inhibitor of nNOS. In the Wistar group, the contractile response to increasing doses of phenylephrine were not modified when PKD was inhibited with CID. In the SHR group, we can identify a reduction in the contractile response in the presence of CID (Phenylephrine $10^{-3.5}$ M; CT = 116.6 ± 13.5 vs CID $60 \pm 14.6\%$, $p < 0.05$). These data suggest the participation of the PKD pathway, in the opposite Useful induced by phenylephrine in the SHR group. Angiotensin II induced a contractile response, in a concentration-dependent manner, in the isolated aortic rings of all studied groups. In the Wistar group, the contractile response to angiotensin II was lower during incubation with DIC, while in the SHR group, PKD inhibition did not modify the contractile response to angiotensin II. In the Wistar group, iNOS inhibition increased the contractile response to angiotensin II when the PKD

enzyme was inhibited, with the CID. In the SHR group, we can see that angiotensin II-dependent contractility was greater in the presence of the iNOS inhibitor, both in the presence and in the absence of PKD. These data suggest that, in the SHR group, NO production depends on the iNOS enzyme. In animals in the SHR group, inhibition of nNOS increased the contractile response to angiotensin II. Inhibition of the PKD pathway reduced the increase in the contractile response to angiotensin II during the inhibition of nNOS. These data suggest that, in the hypertensive group, the NO synthesis pathway, dependent on the nNOS enzyme, participates in the contractile response induced by angiotensin II. In conclusion, the set of results obtained in this study confirms our hypothesis of the participation of the PKD signaling pathway in the acute regulation of ventricular cardiomyocyte functions and in vascular reactivity. In ventricular cardiomyocytes, aldosterone acted directly on nuclear PKD together with HDACs, important regulators in cardiac remodeling. In the cytosol and mitochondria, angiotensin II acutely activated the PKD1 pathway. In relation to vascular reactivity, it was observed that in hypertensive animals, this role of modulating the signaling of the PKD pathway on vascular responses mediated by angiotensin II and phenylephrine, depends on the activation of different NOS isoforms, located in the vascular smooth muscle and endothelium. In the hypertensive group, modulation, via PKD, seems to depend more on the participation of nNOS, while in the normotensive group, on the pathways of eNOS and iNOS.

Keywords: protein kinase D, cardiomyocytes, transfection, calcium transient, contractility, vascular reactivity

1. INTRODUÇÃO

Apesar dos grandes avanços terapêuticos, a insuficiência cardíaca (IC), disfunção sistólica do ventrículo esquerdo e doenças hipertensivas, tem se tornado cada vez mais preocupantes e desafiadores, sendo associada com duros desfechos com número elevados de mortes e internação hospitalar¹. Medicamentos voltados para a regulação neuro-hormonal são os pilares para o tratamento das doenças cardiovasculares. Antagonistas tradicionais do sistema renina-angiotensina, como a enzima conversora de angiotensina (ECA), inibidores e bloqueadores dos receptores da angiotensina diminuíram drasticamente a progressão da doença, reduzindo o número de hospitalizações relacionadas à IC, diminuição nas taxas de mortalidade e melhora na qualidade de vida dos pacientes²⁻⁴. Entretanto, pacientes internados por IC têm uma elevada taxa de eventos cardiovasculares, superior a 50%, com taxa de mortalidade entre 10 e 15% e taxa de re-hospitalização em até 6 meses após a alta de 30 a 40% o que causa grande gastos e superlotações do sistema público de saúde⁵.

A disfunção cardíaca e a arritmogênese, durante a progressão da IC, são alimentadas pelo remodelamento cardíaco que ocorre em resposta a alterações na carga hemodinâmica, lesão cardíaca e/ou ativação neuro-hormonal⁶. Independentemente da causa, o remodelamento cardíaco está associado a alterações na expressão gênica fetal e celular induzindo modificações enérgicas, hipertrofia dos miócitos, morte celular e fibrose. Em cada um desses cenários, o processo de remodelação inicialmente compensatório pode passar por um processo mal adaptativo⁷. Deste modo, a tentativa de identificar novas estratégias terapêuticas, os estudos têm se concentrado nas vias de sinalização que regulam os processos biológicos que impulsionam o remodelamento cardíaco e vascular.

1.1 Célula Cardíaca e a função da Proteína Cinase D (PKD)

No coração, a PKD parece desempenhar um papel fundamental na expressão gênica e no remodelamento mal adaptativo observado na insuficiência cardíaca, tornando essa enzima um potencial alvo terapêutico para as doenças cardiovasculares. A proteína quinase D (PKD), emergiu como um ponto chave de sinalização no processo de acoplamento excitação-contração, expressão gênica, sobrevivência celular e metabolismo⁸⁻¹⁶. Recentemente foi demonstrado que a super expressão cardíaca específica, *in vivo*, da isoforma PKD1 constitutivamente ativa, promove cardiomiopatia dilatada¹⁷. Assim também, a expressão e a atividade da PKD mostraram-se aumentadas em miocárdio de camundongos, ratos, coelhos e humanos com IC¹⁷⁻¹⁹.

1.2 Isoformas da PKD

A PKD é uma enzima da família das serina/treonina-quinases compreendendo três isoformas de PKD homólogas (PKD1/PKC μ , PKD2, e PKD3/PKC ν) e pertence à superfamília da Ca²⁺-calmodulina dependente de proteína cinase (CaMK). A isoforma PKD1 é a isoforma mais estudada e mais abundante no coração. Assim como as outras isoformas da PKD, a abundância de PKD1 está sujeita à regulação de inúmeros processos biológicos²⁰⁻²². Estas enzimas possuem especificidade de substrato, semelhante à CaMK, com características estruturais remanescentes da PKC. A estrutura molecular da PKD consiste em um domínio catalítico C-terminal, uma região N-terminal auto-inibitória, domínios regulatórios, tais como o diacilglicerol (DAG), domínio de ligação e domínio de homologia da Pleckstrin (PH)^{23,24}. Vários mecanismos podem modular a atividade de PKD1, incluindo auto-inibição, fosforilação, degradação proteolítica, localização subcelular e interações de proteínas, resultando em mecanismos complexos de sinalização de PKD específicos do contexto²⁵. A típica cascata de sinalização para ativação de PKD envolve ativação dependente de GPCR (receptor acoplado a proteína G), da fosfolipase C (PLC) e da produção de DAG (diacilglicerol). Estes últimos estimulam a PKD direta e indiretamente através da ativação simultânea de PKC e PKD.

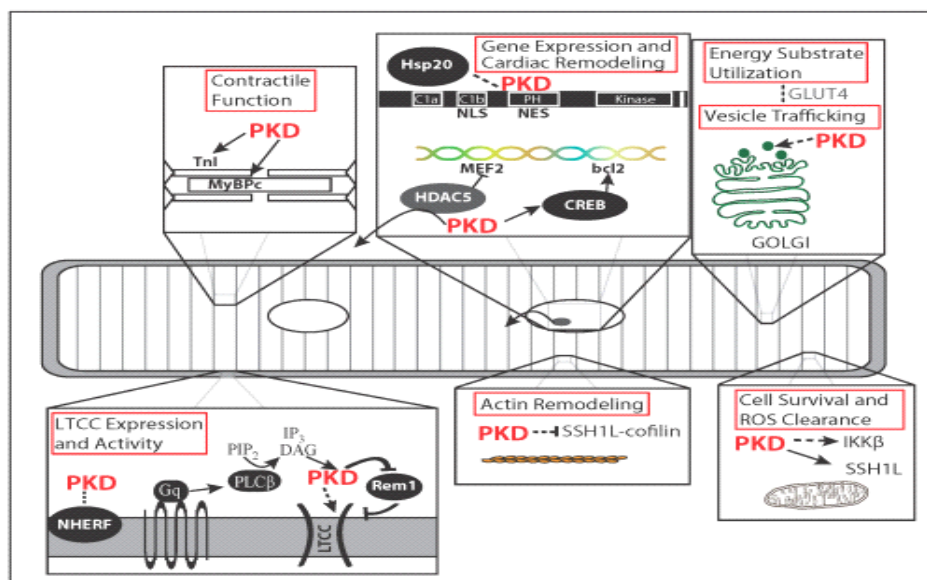
Ambas as isoformas PKC α , β 1, β 2 e γ e PKC δ , ϵ , η , e θ podem fosforilar a PKD no seu sítio de ativação. Em camundongos, a PKD1 pode ser fosforilada por PKCs na Ser-744 e Ser-748, seguida por auto fosforilação na Ser-916. Na PKD1 humana estes locais correspondem a Ser-738 e Ser-742 e Ser-910. A PKD ativa é posteriormente translocada para seus alvos intracelulares^{20, 26-28}.

Estudos demonstraram um mecanismo de ativação não-clássico para a PKD1 em condições de estresse oxidativo²⁹⁻³¹. A cascata de sinalização é iniciada pela produção de DAG mitocondrial através da fosfolipase D, e requer fosforilação de 2 resíduos de tirosina quinase para permitir ativação de PKD1 via fosforilação no loop de ativação por PKC δ . A PKD1 ativada, retransmite a informação da produção das espécies reativas de oxigênio (EROs) mitocondriais ao núcleo, induzindo assim os genes nucleares que medeiam a desintoxicação celular e a sobrevivência celular. No coração, a ligação entre as EROs mitocondriais e a cardioproteção é menos conhecida. Por outro lado, Özgen et al.,³² identificaram uma via específica para PKD1 relacionada a baixos níveis de H₂O₂ à diminuição da abundância de proteína do elemento de resposta de ligação a AMPc (ERK) em miócitos cardíacos neonatais, o que contribuiria para a patogênese da insuficiência cardíaca. Pesquisadores

identificaram os efeitos protetores da sinalização de PKD em um modelo de lesão de isquemia/reperfusão, mas esses efeitos foram mediados via sinalização de RhoA^{33, 34}.

Mais recentemente, estudos identificaram proteína semelhante à dinamina (DLP1), uma proteína de fissão mitocondrial, como um novo alvo da PKD³⁵. Em seu estudo, a sinalização prolongada de receptores α -adrenérgicos aumentou a fragmentação e disfunção mitocondrial com aumento da sinalização apoptótica, geração de EROs, e aumento da permeabilidade mitocondrial. Erickson et al.³⁶ mostraram que a modificação, dependente de EROs, da metionina 281 e 282, conferiu atividade autônoma de Ca^{2+} à CaMKII, em um mecanismo análogo, mas independente da auto-fosforilação. Dada a reconhecida susceptibilidade dos resíduos de metionina e cisteína à oxidação, eles também estabeleceram que a oxidação dos resíduos de metionina emparelhados, mas não apenas um resíduo de cisteína ou metionina, era necessária para a ativação de CaMKII por EROs. Todas as 3 isoformas de PKD apresentam tal emparelhamento de cisteína/metionina (posição C653 / M654 em PKD1) e a substituição de valina destes resíduos torna a PKD1 insensível a estímulos das EROs.

A PKD1 é cada vez mais reconhecida como regulador chave de uma série complexa de processos fisiológicos fundamentais, incluindo transdução de sinal, proliferação e diferenciação celular, transporte através da membrana, secreção,



expressão gênica, utilização de substrato, remodelamento da actina e contratilidade, conforme observado na figura 1 abaixo:

Figura 1. Funções do microdomínio da Proteína Cinase D (PKD) no cardiomiócito. Na figura acima, podemos observar a atuação da PKD em diferentes regiões da célula cardíaca (sarcolema, citosol, núcleo, mitocôndria, complexo de golgi⁸.

Sabe-se que membros da superfamília da CaMK, que incluem CaMKII, PKD e quinase associada a microtúbulos (MARK), são conhecidos por regular a expressão gênica cardíaca patológica através de seus efeitos sobre as histonas desacetilases classe IIa (HDACs)³⁷. As HDACs funcionam como reguladores importantes no remodelamento cardíaco através da associação com o fator de transcrição do fator potenciador do miócito-2 (MEF2) e outros reguladores transcricionais pró-hipertrofos. As ações das HDACs de classe II são controladas pelo seu estado de fosforilação que regula sua distribuição núcleo-citoplasmática. Estímulos extracelulares transmitidos por GPCR ativam PKD e CaMKs, que fosforilam HDACs classe II, desencadeando a exportação nuclear, a repressão ao MEF2 e promovendo remodelação cardíaca.^{18, 38}

Estudos recentes também destacaram a importância da regulação espaço-temporal da sinalização do PKD em cardiomiócitos. Por exemplo, os agonistas dos GPCR, endotelina e fenilefrina, diferem na ativação espaço-temporal da PKD: com a fenilefrina provocando sinalização sarcolemal transitória, seguida de rápida atividade nuclear, enquanto a exposição a endotelina resulta em recrutamento de PKD da membrana celular. Esses achados explicam como a sinalização via fenilefrina e endotelina convergem na ativação da ativação nuclear de histona desacetilase 5 (HDAC5) e da transcrição gênica, que é mais dependente de PKD para fenilefrina, porém mais dependente de PKD e CaMKII para endotelina³⁹.

Pesquisas usando biossensores fluorescentes para sinalização de PKD, mostraram que a sinalização β -adrenérgica (β -AR) induz seletivamente a sinalização PKD nuclear, sem translocação inicial para o sarcolema. A sinalização via β -AR também preveniu a ativação de PKD mediada por GPCR, impedindo sua translocação intracelular. Este efeito foi mediado pela fosforilação dependente de PKA e de PKD.⁴⁰

Curiosamente, enquanto o papel da PKD sinalizando a jusante de agonistas do GPCR, como fenilefrina e endotelina, tem sido bem estabelecido, menos atenção tem sido dada ao sistema renina-angiotensina-aldosterona (SRAA). Apesar do fato de que o sistema nervoso simpático e o SRAA estarem entre as respostas homeostáticas mais reconhecidas e compensatórias a uma queda no débito cardíaco e mais direcionadas terapêuticamente na doença cardiovascular¹⁶, ele atua também na regulação do sistema cardiovascular por meio de múltiplos tipos de receptores, principalmente via receptores AT1 e AT2^{17,41}. O hormônio angiotensina II é um mediador crucial na manutenção da pressão arterial e homeostase dos fluidos, via mecanismos de ação

que incluem secreção de aldosterona, efeitos vasopressivos, conservação hidrosalina, efeitos no sistema nervoso, como regulação do fluxo simpático e efeito dipsogênico.

A aldosterona, descoberta há mais de 70 anos, age através do receptor mineralocorticoide (MR), para modular a expressão gênica em tecidos alvos. No rim, a principal ação da aldosterona é promover a reabsorção de Na^+ no néfron distal e, assim, aumentar indiretamente a conservação de água (regular o volume do líquido extracelular e a pressão arterial)⁴².

Os altos níveis circulantes de aldosterona, estão diretamente relacionados à hipertrofia cardíaca, fibrose intersticial e a insuficiência cardíaca^{22-25,27}. Da mesma forma, a hiperestimulação dos receptores AT1 está ligada a várias doenças humanas, como hipertensão e hipertrofia cardíaca.

Recentemente, foi estabelecido um papel para a PKD na regulação do SRAA (Figura 2). A PKD renal modula a secreção de renina⁴² e medeia o tráfego de transportadores de sódio no néfron em resposta à aldosterona⁴⁰. A secreção de aldosterona induzida por angiotensina II em células adrenocorticais,⁴³⁻⁴⁵ regula assim os níveis circulantes de aldosterona; e nas células do músculo liso vascular, a sinalização de PKD medeia a resposta hipertrófica à angiotensina II^{46, 47}. Em um estudo proteômico, os autores identificaram a PKD como um mediador crucial de eventos de sinalização de angiotensina II fosforilação dependente⁴⁸. Entretanto, não se sabe ainda se a sinalização da PKD também desempenha um papel crítico na mediação dos efeitos da angiotensina II e/ou aldosterona em cardiomiócitos e vasos sanguíneos.

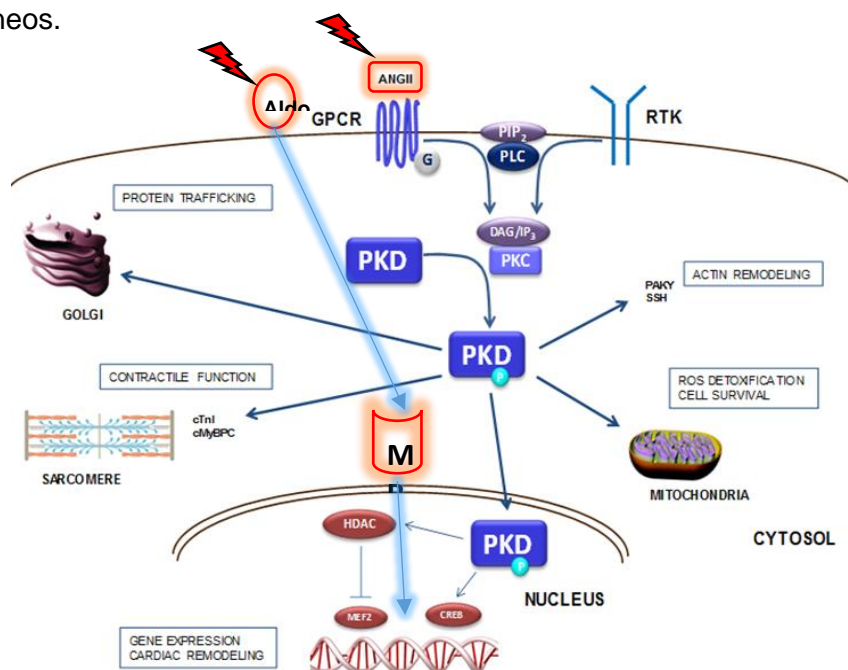


Figura 2. Via de sinalização da PKD a jusante pela aldosterona e angiotensina II na célula cardíaca (modificada)^{8,40}.

1.3 Músculo Liso Vascular

Alterações no diâmetro dos vasos sanguíneos servem como um importante regulador fisiológico do fluxo sanguíneo. Essas mudanças relacionadas ao músculo liso e regulação do tônus vascular são responsáveis pelo aumento e diminuição da pressão arterial. Alguns pontos importantes como: estímulos hormonais, manipulação de agentes farmacológicos, inervação e deservação, quantidades de neurotransmissores e receptores, fatores derivados do endotélio, possuem um papel importante na resistência vascular que é determinada pelo tônus do músculo liso vascular.

Para que ocorra contração das células musculares lisas vasculares, é necessário, elevação na concentração de Ca^{2+} citoplasmático. Este aumento se faz devido ao influxo desse mesmo íon através de canais especializados na membrana citoplasmática e de estoques intracelulares do retículo sarcoplasmático^{40,49}. Resumidamente, existem dois principais mecanismos responsáveis pela contração do músculo liso vascular: o acoplamento eletromecânico que permite a contração por meio de alterações no potencial de membrana da célula. Uma vez que ocorre a despolarização da membrana pelo aumento da concentração de K^+ extracelular, promove influxo de Ca^{2+} através da abertura de canais para cálcio operados por voltagem, causando contração^{39, 50,51}. E o acoplamento farmacomecânico que se fundamenta na contração induzida por agonistas contráteis (norepinefrina, endotelina, angiotensina II e serotonina). Esses agonistas, ligam-se a receptores específicos da membrana da célula muscular lisa que são acoplados à proteína G. A interação agonista-receptor ativa a subunidade α da proteína G, ativando a fosfolipase C (PLC) que eleva à síntese de 1,4,5-trifosfato de inositol (IP3) e diacilglicerol (DAG). O IP3 atua interagindo com seus receptores na membrana do retículo sarcoplasmático estimulando a liberação de Ca^{2+} . Dando sequência, o DAG atua ativando a proteína quinase C (PKC), que por sua vez, aumenta o movimento de Ca^{2+} através de canais da membrana. E também, aumenta a sensibilidade das proteínas contráteis ao Ca^{2+} e fosforilação da cadeia leve da

miosina (MLC). Todos esses mecanismos estão relacionados ao aumento do Ca^{2+} para que ocorra a contração de maneira efetiva. O Ca^{2+} se liga à calmodulina, forma o complexo Ca^{2+} -calmodulina ocorrendo ativação da quinase de cadeia leve da miosina (MLCK), o que promove interação entre os miofilamentos de actina e miosina, responsáveis pela contração muscular que, em última análise, regula a resistência vascular, e conseqüentemente, regula a pressão arterial^{19,52,53}.

1.4 Receptores α -Adrenérgicos Vasculares

Os receptores α -adrenérgicos pertencem a família de GPCRs, que podem ser ativados pelas catecolaminas adrenalina, noradrenalina e por moléculas sintéticas como a fenilefrina.

Os receptores α -adrenérgicos são divididos e subdivididos em $\alpha 1A$, $\alpha 1B$, $\alpha 1D$, $\alpha 2A$, $\alpha 2B$, $\alpha 2C$. Receptores $\alpha 1$ estão relacionados com respostas no órgão efector e os receptores $\alpha 2$ estão localizados principalmente na membrana pré-sináptica e regulam a liberação de neurotransmissores. Os receptores $\alpha 1$ estão acoplados à fosfolipase C, gerando assim IP3 e DAG como segundos mensageiros, e têm seus efeitos mediados principalmente pela liberação de Ca^{2+} intracelular. Já os receptores $\alpha 2$ estão negativamente acoplados à adenilato ciclase, promovendo sua inibição, reduzindo assim a formação de adenosina monofosfato cíclico (cAMP) e inibindo canais de cálcio^(54,55). Em consequência do aumento na concentração de cálcio citosólico, há formação de um complexo com a calmodulina, que é capaz de ativar a enzima responsável pela fosforilação das cadeias leves da miosina (proteínas regulatórias), a MLCK. A fosforilação da cadeia leve da miosina permite que a miosina se ligue aos filamentos de actina levando à contração muscular. Ao contrário, o relaxamento ocorre quando vasodilatadores como por exemplo, o NO, ativam uma cinase que inibe a MLCK, ou ativa a miosina fosfatase, desfosforilando a cadeia leve da miosina^{56,57}.

1.5 Receptores para Angiotensina II

A angiotensina II, além de alterar a reatividade vascular, exerce importante ação pró-inflamatória na parede vascular através da produção de

EROs, citocinas inflamatórias e moléculas de adesão (Savoia & Schiffrin, 2007)⁵⁸. A angiotensina II ativa a NADPH oxidase, levando ao aumento do ânion superóxido, peróxido de hidrogênio e radicais hidroxila, exercendo um efeito relevante sobre o leito vascular, através da indução do estresse oxidativo^{58,59}. Assim, alterações no SRA frequentemente estão associadas ao desenvolvimento de doenças cardiovasculares como aterosclerose, hipertensão arterial e insuficiência cardíaca^{60,61}.

As respostas mediadas pela angiotensina II aumentam a atividade simpática cardíaca e vascular, levando a um efeito vasoconstritor direto, que aumenta a resistência vascular periférica e, conseqüentemente, a pressão arterial⁶². Na maioria das vezes, a principal via dessas respostas é mediada pelo receptor AT1.

Por outro lado, as ações mediadas via receptor AT2 são menos conhecidas, o que pode ser explicado pela menor expressão desses receptores quando comparado com a do receptor AT1. Além disso, no geral, as ações da angiotensina II, via AT2, são antagonistas às ações mediadas via angiotensina II em receptores do tipo AT1⁶³. A ação da angiotensina II sobre os receptores AT1 pode ser descrita sucintamente por causar vasoconstrição e aumentar da proliferação e o crescimento celular. As ações da angiotensina II, via receptores AT2, via de regra, antagonizam os efeitos dos receptores AT1 e induzindo respostas anti-proliferativa e anti-apoptótica. Os receptores AT2 são importantes na regulação do crescimento, na diferenciação e na regeneração do tecidual. Após o nascimento ocorre redução na expressão dos receptores AT2, mas que pode vir a ser induzida nas doenças cardiovasculares, incluindo a hipertensão arterial e insuficiência cardíaca^{64,65}.

Outra diferença importante entre esses dois tipos de receptores para angiotensina II, está relacionada com a cascata de sinalização intracelular. A ativação de receptores AT2 é capaz de ativar a *Protein serine/threonine Phosphatase 2A* (PP2A), que direciona o sinal para o controle da atividade de canais para K⁺ e Ca²⁺⁶⁶. Por esta via, ocorre regulação negativa da ativação da cascata *Mitogen Activated Protein Kinase* (MAP Cinase), a qual pode ser ativada via receptor AT1 e da fosfolipase citosólica A2 (cPLA2)⁶⁷. Os receptores AT2 são encontrados em maior quantidade na aorta e coronária.

Seus efeitos fisiológicos são antagônicos aos do AT1 e incluem diversas ações, como vasodilatação através da liberação de NO e bradicinina.

A ação da angiotensina II sobre o receptor AT1 ocorre por vias mediadas pelo GPCR, o qual por sua vez estimula a fosfolipase C, induzindo a formação de IP3 e DAG, liberando Ca^{2+} citoplasmático ativando a PKC, a adenil-ciclase e a PKD. A angiotensina II também estimula a musculatura lisa vascular, através de vias de sinalização, como a fosfolipase C, fosfolipase A2 e fosfolipase D ⁶⁸.

1.6 Endotélio vascular

Durante muitos anos o endotélio vascular foi considerado apenas uma barreira física, passiva e inerte, entre o sangue o musculo liso vascular. Estudos recentes⁶⁹⁻⁷² tem demonstrado outras funções importantes, sendo considerado um tecido ativo, dinâmico e com importantes propriedades como: regulação do tônus vascular através da liberação de fatores vasodilatadores ou vasoconstritores, permeabilidade microvascular, agregação plaquetária, adesão leucocitária, sinalização e angiogênese vascular e resposta inflamatória, por meio de componentes da circulação e controle do estresse oxidativo.

A regulação do tônus vascular acontece através da liberação de vários fatores vasodilatadores conforme mostrado na figura 3, que em condições fisiológicas, permanecem em equilíbrio.

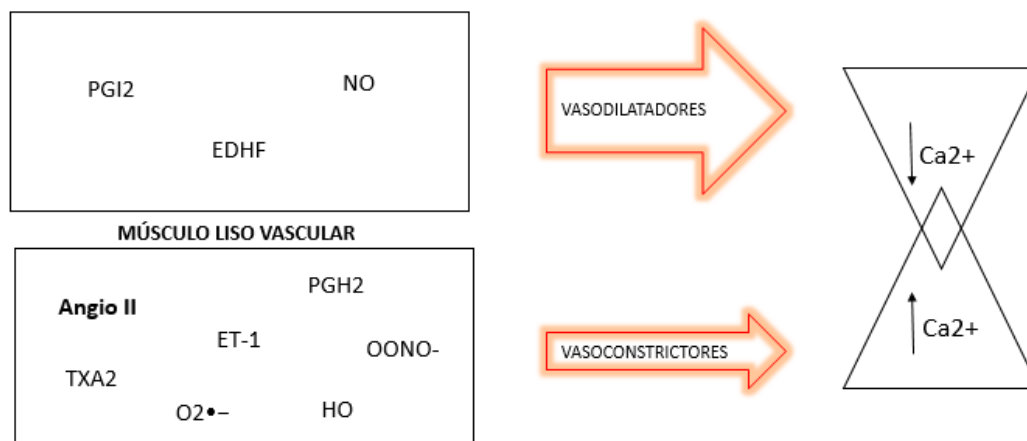


Figura 3. As células endoteliais dependendo do estímulo recebido, liberam fatores que levam à contração ou relaxamento no músculo liso vascular. Fatores vasodilatadores {Óxido nítrico (NO), fator hiperpolarizante derivado do endotélio (EDHF) prostaciclina (PGI₂)} produzidos pelo endotélio, que ao atuarem no músculo liso vascular (MLV) ocasionam na diminuição de Ca²⁺ intracelular levando a vasodilatação. Fatores vasoconstritores {endotelina-1 (ET-1) Angiotensina II (Angio II); prostaglandinas H₂ (PGH₂); tromboxano A₂ (TXA₂); peroxinitrito (OONO⁻); ânion superóxido (O₂^{•-}); e radical hidroxila (HO[.])} também produzidos pelo endotélio, responsáveis pelo aumento de Ca²⁺ no citoplasma da célula do músculo liso vascular ocasionando na vasoconstrição⁷².

O desequilíbrio na produção dessas substâncias pelo endotélio, tem sido relacionado a várias doenças, tais como: isquemia, trombose, aterosclerose, hipertensão arterial, inflamação e crescimento tumoral. Sendo assim, a disfunção endotelial vascular compõe um importante fator fisiopatológico em muitas doenças⁷³. Vale observar que entre as substâncias produzidas pelo endotélio, o NO, um gás de meia vida curta e altamente difusível por membranas celulares, sintetizado pelo óxido nítrico sintase, é considerado um potente modulador da função cardiovascular e apresenta importantíssima ação fisiológica. Em condições fisiológicas sua produção é estimulada através do estresse de cisalhamento conhecido também como *shear stress*⁷¹ e da estimulação de receptores de membrana por agonistas como acetilcolina, bradicinina, adenosina difosfato. Além de produzir vasodilatação, possui capacidade de inibir a agregação e adesão leucocitária e plaquetária à parede vascular⁷⁴.

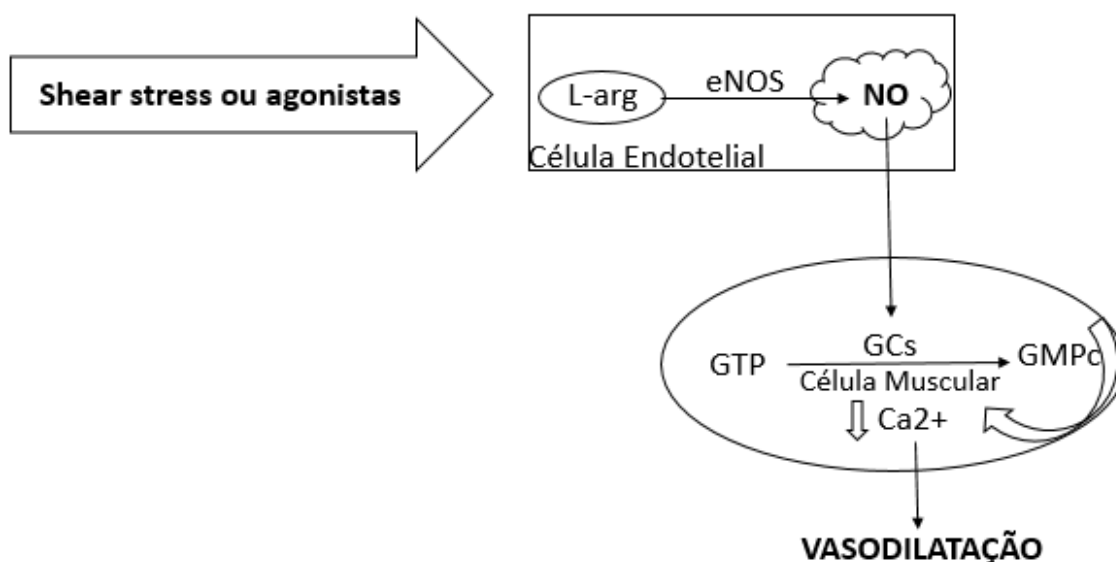


Figura 4. Síntese, liberação e ação do NO e o papel da eNOS na sua produção. O óxido nítrico como o produto da reação de oxiredução da L-arginina quando liberado, difunde-se rapidamente da célula geradora para as células endoteliais para a musculatura lisa do vaso

sanguíneo. Na célula muscular lisa, o NO ativa uma enzima catalítica, a guanilato ciclase solúvel (GCs) que por sua vez irá formar o monofosfato de guanosina cíclico (GMPc), a partir da quebra do trifosfato de guanosina (GTP). A formação do GMPc promove o acionamento da bomba de cálcio dentro da célula muscular lisa, diminuindo as concentrações de cálcio intracelular levando a diminuição do tônus vascular ^{75 modificada}.

Entretanto, produções insuficientes de NO, podem estar relacionadas ao aumento de EROs, como ocorre no envelhecimento e em outras doenças, como na hipertensão arterial, afetando adversamente a capacidade física e a saúde em geral.

Dada à sua importância clínica, a disfunção endotelial é considerada como preditora de risco cardiovascular^{70,73,75}. Conforme citado anteriormente⁵, as doenças cardiovasculares se destacam pela sua grande taxa de mortalidade e altos custos com internações. A ação benéfica do NO na regulação da PA, nas doenças tromboembólicas e nas dislipidemias está bem estabelecida^{75,76}.

Conforme descrito na literatura, as enzimas responsáveis por catalisar a produção de NO a partir da L-arginina são as Óxido Nítrico Sintases (NOSs). As três isoformas da NOS são classificadas em dois grupos: NOS constitutiva (c-NOS) e a NOS induzível (iNOS). Sendo a isoforma constitutiva carece da interação com a calmodulina, que é dependente do aumento dos níveis de cálcio, para sua ativação. Há dois tipos de c-NOS, a NOS endotelial (eNOS) e a NOS neuronal (n-NOS) que são ativadas em condições fisiológicas. Em contrapartida, a iNOS é induzida por estímulos pró-inflamatórios, e sua ativação é independente da concentração intracelular do Ca^{2+} ⁷⁶⁻⁷⁸.

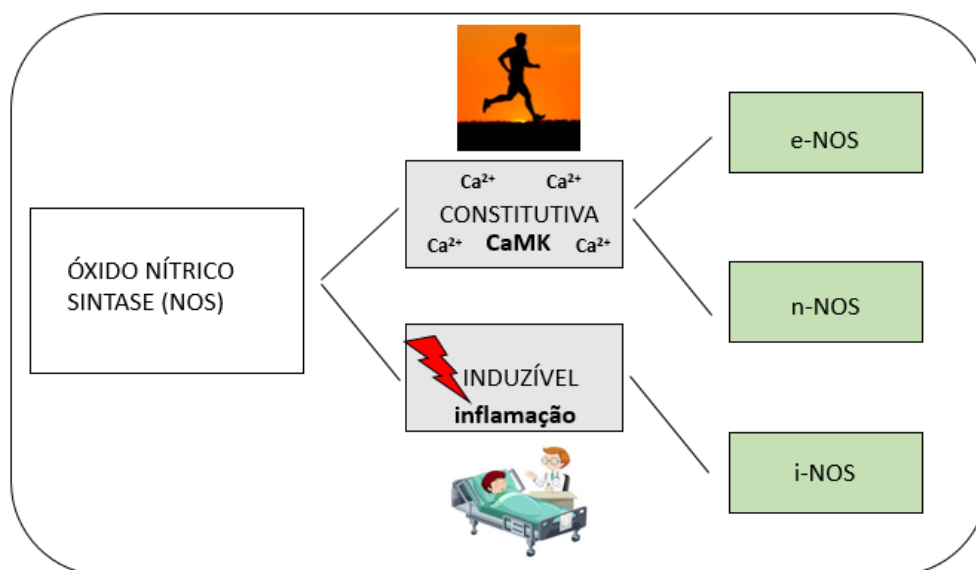


Figura 5. Isoformas da Óxido Nítrico Sintase. Pode ser observado que as isoformas constitutivas são dependentes de Ca^{2+} e geradas a partir do processo fisiológico e que a isoforma induzível provocada por um processo patológico como por exemplo um processo inflamatório.⁷⁶⁻⁷⁸

As NOSs, são enzimas responsáveis pela síntese de NO, molécula de sinalização biológica envolvida no controle cardiovascular, imunológica e do sistema nervoso^{79,80}. A nNOS é produzida em maior quantidade em estado fisiológico do que a eNOS e iNOS. Isto se dá, principalmente a sua extensão N-terminal com cerca de 300 aminoácidos contendo um domínio PDZ (domínio estrutural, com cerca de 80-90 aminoácidos, encontrado em proteínas sinalizadoras de bactérias, leveduras, plantas e animais.)^{81,82}. A associação desta sequência N-terminal com outras proteínas neuronais determina o aumento de nNOS em terminações pós-sinápticas.

A proteína pós-sináptica PSD-95 se liga ao terminal C do tipo ionotrópico de N-metil-D-aspartato (NMDA) de receptores de glutamato (NMDARs) por meio de PDZ1 e a nNOS do PDZ2, compondo um complexo ternário em neurônios^{83,84}. No entanto, a ativação da nNOS é aumentada após a estimulação fisiológica ou patológica de NMDARs, levando a síntese de NO⁸⁴⁻⁸⁶. No cérebro, os NMDARs também se associam ao substrato de 220-kDa {Kidins220/ARMS (encontradas em células do sistema imunológico, os linfócitos B), interagindo com a quinase D⁸⁷.

Além disso, foi demonstrado que a PKD1 ativa a nNOS fosforilando o resíduo ativador Ser1412, levando ao aumento da produção de NO, estabelecendo, assim, um novo papel da PKD na regulação da síntese do NO, conforme descrito acima, apresenta um importante papel na regulação da PA.

1.7 Modelo Experimental para Estudo da Hipertensão Arterial: SHR

A pesquisa básica, usando modelos experimentais, se aproximou mais da experimentação clínica de hipertensão arterial, após o desenvolvimento por Okamoto & Aoki (1963)⁸⁸, de uma cepa de ratos *wistar* espontaneamente hipertensos (SHR), o qual é um modelo de hipertensão arterial crônica amplamente utilizado na avaliação da hipertensão essencial e com grandes similaridades em humanos. Essa semelhança se dá devido aos roedores

apresentarem respostas endócrinas e hemodinâmicas similares as dos humanos no desenvolvimento da hipertensão essencial. Os animais SHR apresentam um aumento gradual (tempo dependente) da pressão arterial, o que torna sua utilização mais vantajosa em relação aos outros modelos experimentais. O prejuízo da função cardíaca em longo prazo, é o responsável pelo aumento crônico da pressão arterial, levando ao surgimento da IC que pode ser observada nesses animais em idades mais avançadas. A elevação da pressão arterial no modelo SHR surge a partir da quinta semana de vida, sendo considerado hipertenso por volta da sétima semana.⁸⁸

1.8 Fisiologia dos vasos sanguíneos

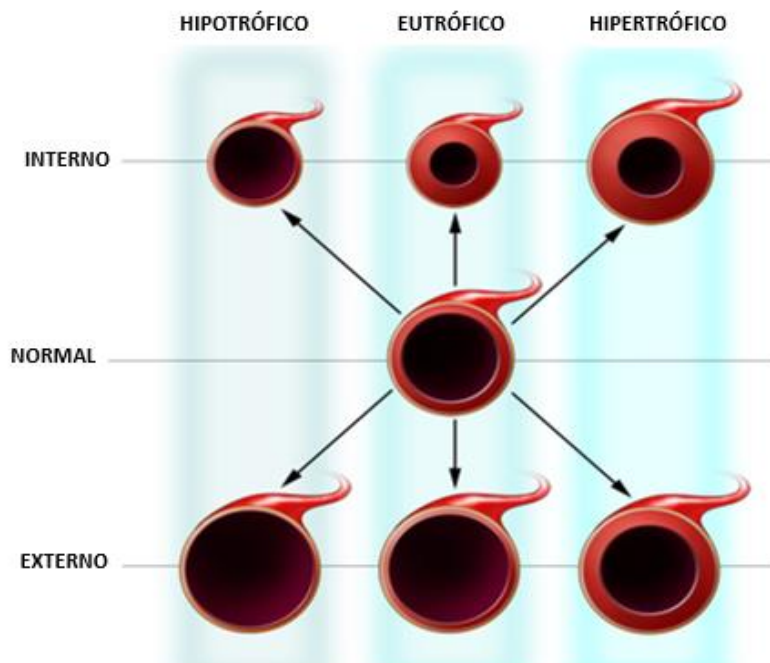
A parede arterial é organizada em três camadas concêntricas conhecidas como túnicas: adventícia, média e íntima. A túnica íntima, camada mais interna de células que envolve o lúmen, é formada por camada elástica, composta por um arranjo linear e longitudinal de células endoteliais e membrana basal. A túnica média, tecido envolvido entre a lâmina elástica interna e a externa, combinado por células musculares lisas dispostas em forma circunferencial junto a matriz extracelular rica em colágeno, elastina e proteoglicanos. A túnica adventícia, localizada externamente à lâmina elástica, é composta de fibroblastos dispostos longitudinalmente, juntamente à matriz extracelular composta por colágeno, elastina, pequenos vasos e terminações nervosas.

Segundo a Lei de Poiseuille, a resistência vascular periférica varia inversamente ao raio do vaso a quarta potência ($R = 8\eta L/\pi r^4$, onde η = viscosidade; L = comprimento; r = raio). Ou seja, pequenas alterações do diâmetro luminal, podem influenciar grandemente na resistência vascular periférica e, conseqüentemente, levar a uma modulação significativa da pressão arterial. Entretanto, alterações nos padrões dos vasos, como no remodelamento vascular, podem ocorrer devido a alterações na função (reatividade vascular), na distensibilidade (rigidez vascular) ou na estrutura vascular, o que compromete os parâmetros hemodinâmicos fisiológicos⁸⁹⁻⁹¹. Entretanto, o remodelamento das artérias, ocorrem como consequência do aumento na pressão sanguínea para normalizar a tensão da parede na artéria. Ou seja, o aumento da pressão arterial na hipertensão é devido ao aumento na

razão diâmetro e a espessura da parede vascular (razão P/L) arterial. Pode ser observado também, um aumento na quantidade de substâncias neuro-humorais capazes de elevar a pressão sanguínea, modificando a tensão da parede nas artérias. E para normalizar a tensão de parede em longo prazo, a pressão arterial elevada é mantida pelo aumento da razão P/L dos vasos⁹².

O remodelamento arterial é considerado um processo complexo que pode envolver tanto um aumento (hipertrofia), diminuição (hipotrofia) e ou rearranjo (eutrofia) dos elementos da parede vascular a redução (remodelamento para dentro) ou o aumento (remodelamento para fora) do diâmetro do lúmen vascular ⁹³.

A)



B)

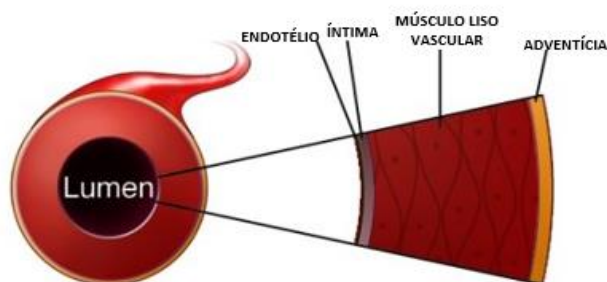


Figura 6. A figura acima mostra a categorização de artérias em relação ao remodelamento arterial. (A) O remodelamento vascular pode modificar as secções transversais dos vasos sanguíneos, podendo ser hipertrófico (maior área da camada média; eutrófico (sem mudanças na área da camada média; ou hipotrófico (menor área da camada média. Essas formas de remodelamento podem ser interna (redução do diâmetro interno) ou externa (aumento do diâmetro interno). (B) Estrutura das camadas arteriais (*adaptado de Carretero et al, 2005*).⁹⁴

1.9 Justificativa do Estudo

Até o momento, já se conhece bem o papel regulatório e modulatório do SRAA e do sistema nervoso autônomo (SNA), sobre a função cardiovascular, e que os hormônios e neurotransmissores podem atuar nos vasos e coração, modulando diversas vias de sinalização intracelular. Muito embora as vias de sinalização das enzimas PKA e PKC sejam mais bem estudadas e conhecidas, a via de sinalização da PKD tem sido pouco estudada. A grande maioria dos estudos tem avaliado a função da PKD em cultura de células ou estudos bioquímicos, mas não em estudos funcionais.

A isoforma PKD1 é cada vez mais reconhecida como um regulador chave de uma série complexa de processos fisiológicos fundamentais, incluindo: transdução de sinal, proliferação e diferenciação celular, transporte

através da membrana, secreção, expressão gênica, utilização de substrato, e regulação da contratilidade miocárdica. Entretanto, pouco se sabe sobre a atuação da PKD1 sobre a reatividade vascular e regulação de cardiomiócitos.

Neste estudo, usaremos um modelo experimental animal, que mimetiza a hipertensão essencial em humanos, para que possamos averiguar a hipótese de que, a PKD seja um mediador dos efeitos do SRA e do SNA simpático sobre a reatividade vascular. Cardiomiócitos de coelhos e camundongos saudáveis, serão usados para avaliarmos a participação da via da PKD, sobre a regulação funcional cardíaca, mediada pela angiotensina II, aldosterona e agonista adrenérgico.

2. OBJETIVOS

Avaliar a sinalização intracelular da proteína kinase D (PKD) sobre:

- A função de cardiomiócitos ventriculares isolados.
- A reatividade vascular em vaso de condutância, na aorta torácica, de ratos Wistar e SHR, evidenciando o papel do endotélio vascular.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Estudo Funcional em Cardiomiócitos Ventriculares Isolados

3.2 – Animais Parte I

Todos os procedimentos com animais foram conduzidos em conformidade com as diretrizes do NIH para pesquisa em animais e aprovadas pelo Comitê Institucional de Cuidados e Uso de Animais da Universidade da Califórnia, em Davis (projeto de aprovação#19279). Os procedimentos de risco biológico foram realizados de acordo com uma Autorização de Uso Biológico aprovada pela UC Davis.

3.3 – Isolamento de miócitos ventriculares de coelho

Os miócitos ventriculares de coelho foram isolados conforme Bossuyt et al., 2011. Resumidamente, os miócitos foram isolados de coelhos brancos da Nova Zelândia machos adultos com 3-4 meses de idade, provenientes do laboratório internacional Charles River (Inc., MA, EUA). Aproximadamente 5-30 minutos após a injeção de heparina, os coelhos foram submetidos a anestesia geral induzida por injeção intravenosa de Propofol 2mg/kg seguida de anestesia gasosa com 2-5% de isoflurano em oxigênio a 100% administrado via dispositivo supraglótico (V-gel®, Jorgensen Labs, CO, EUA). Após toracotomia, o coração foi exposto e rapidamente extirpado e lavado em meio essencial gelado mínimo isento de Ca^{2+} (contendo 135 mM de NaCl, 0,33 mM de $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 5,31 mM de KCl, 1 mM de MgCl, 2 mM de $\text{C}_3\text{H}_3\text{O}_3 \cdot \text{Na}$, 10 mM de HEPES, Na-HEPES 10 mM, glucose 5,5 mM, 0,04% de insulina, 0,5% de penicilina/ estreptomicina, pH 7,4). A aorta foi canulada e pendurada em um sistema de perfusão conhecido como Langendorff. Uma solução de lavagem (MEM com 4 U/mL de heparina) foi perfundida a uma taxa de 25-65 mL/min até que todo o sangue fosse removido do coração. Durante o processo de isolamento dos cardiomiócitos, o coração foi perfundido por uma solução

enzimática por um período aproximado de 20-26 minutos. A solução enzimática consiste em colagenase B (Roche Diagnostics Corporation, Indiana, EUA) e protease (Sigma). Os ventrículos foram removidos, cortados em pequenos pedaços e colocados em solução contendo 2% de BSA e 25 μ M de CaCl_2 em MEM. Os pedaços de ventrículo foram colocados em tubos e invertidos várias vezes até que o tecido do ventrículo fosse totalmente dissociado. Logo após, a mistura celular foi filtrada com malha de nylon de 240 micron.

Os miócitos isolados foram plaqueados e inseridos em meio de cultura revestidos com laminina em meio suplementado com 0,1% de BSA, suplemento de meio líquido (ITS - Sigma), concentrado lipídico quimicamente definido (Thermo Fisher Scientific) e 1% penicilina-estreptomicina^{39,49}. Miócitos não aderentes foram lavados após 1 hora e os miócitos foram expostos a adenovírus recombinante deficiente para replicação expressando PKD1-GFP (WT ou variante resistente à oxidação CM653/4VV) ou variantes DKAR, a uma multiplicidade de infecção 10-50 com cultura subsequente durante 15-28 horas. As variantes de DKAR utilizadas foram DKAR-núcleo, DKAR-citoplasma e DKAR-mitocôndria para atingirem o núcleo, citosol e mitocôndria, respectivamente³⁹. A fluorescência da GFP (CFP/YFP para DKARs) indicou infecção e localização dos vetores.

3.4 – Medidas de transferência de energia através da ressonância de fluorescência confocal e de fluorescência da sinalização de PKD - FRET

A Transferência de Energia por Ressonância de Fluorescência (FRET) ocorre quando a energia do estado excitado de um doador (Proteína Ciano Fluorescente - CFP) é transferida a um fluoróforo acceptor (Proteína Fluorescente Amarela - YFP) resultando em sobreposição espectral entre a emissão do doador e a absorção do acceptor³⁹. O experimento era realizado após um período superior de 15 horas para permitir a expressão do biosensor, os miócitos dos coelhos foram removidos da incubadora e o meio acrescido de solução de NT contendo 1,8 mM de CaCl_2 . As células eram tratadas com 100 nM de angiotensina II ou aldosterona e as respostas celulares registradas.

3.5 – Medidas confocais de espaço-tempo da translocação PKD

A translocação intracelular do tipo selvagem de PKD1 marcado com GFP (WT) ou do mutante resistente à oxidação CMVV (653/654) foi mensurada por microscopia confocal usando excitação de laser de argônio a 488 nm e fluorescência emitida (F) coletada > 505 nm. O software Image J (<http://rsb.info.nih.gov/ij/>) foi utilizado para análise com a intensidade das regiões de interesse normalizadas para área (F_{nuc} e F_{cito})^{39,95}.

3.6 – Medida indireta da atividade da PKD por meio da técnica: FRET DKAR

Foram utilizados Repórteres Ativadores de Cinase D (DKARs) para medir a atividade da PKD em diferentes locais dos cardiomiócitos. Utilizou-se uma abordagem ratiométrica não destrutiva para medir as mudanças de transferência de energia por fluorescência dependente do tempo (FRET). Uma transferência de energia por ressonância de fluorescência, um fenômeno espectroscópico sensível a alterações na conformação, orientação e/ ou distância entre dois fluoróforos^{39,95}.

As emissões de CFP e YFP foram medidas após a excitação do CFP). Para este estudo, as medidas FRET ratiométricas foram realizadas usando a função MATL do FV1000 Olympus confocal com excitação CFP usando a linha de laser de 440 nm e fluorescência emitida para CFP coletado em 460-500nm (FCFP) e para YFP em 520-600nm (FYFP). As intensidades de fluorescências foram corrigidas para o background e as alterações de DKAR FRET em locais celulares específicos foram relatadas como FCFP / FYFP normalizadas para a razão inicial^{39,40}.

3.7 – Cardiomiócitos ventriculares de camundongos

Os cardiomiócitos ventriculares foram isolados conforme descrito anteriormente⁵¹ a partir de corações de camundongos de linhagem C56BL6 e divididos em dois grupos, sendo eles: do tipo selvagem WT e PKD1 KO (*knockout*) cardíaco-específicos. Esses camundongos PKD1 foram adquiridos no biotério da UC DAVIS e criados de acordo com o procedimento descrito em Fielitz et al.¹⁹ Os camundongos receberam intraperitonealmente (ip) heparina (8000 unidades/kg de peso corporal) e logo após, foram colocados em câmaras

de isoflurano (3-5%) para induzir a anestesia, conforme procedimento aprovado pelo comitê de ética local (UCDavis).

Os camundongos foram subsequentemente colocados em decúbito dorsal num campo cirúrgico preparado enquanto a anestesia era mantida com isoflurano (1-3%). Após toracotomia, os corações foram extirpados, a aorta foi canulada para perfusão retrógrada através do Langendorff. Os corações foram perfundidos com solução de Tyrode isenta de Ca^{2+} gaseificada com 100% de oxigênio (4 min, 37 C), antes de mudar para uma solução enzimática contendo 0,075 mg/ml de Liberase TM (Roche) e tripsina (0,0138%, Gibco). Uma vez que o coração ficou flácido, os ventrículos foram cortados e colocados em solução normal de Tyrode (NT) suplementada com soro bovino fetal. O tecido foi cortado em pedaços menores e logo após os miócitos foram filtrados através de uma malha de nylon. Miócitos isolados foram assentados por gravidade por 5-10 min. Durante este processo os miócitos foram transferidos para três tubos falcons de 10 ml contendo solução de NT e com concentrações gradativas de cloreto de cálcio (CaCl_2) 0,125 a 0,25 a 0,5 mM respectivamente.

3.8 – Imagem confocal do transiente de cálcio e da contratilidade em miócitos de camundongos ventriculares intactos

Os cardiomiócitos isolados foram deixados em repouso em solução normal de Tyrode (NT) contendo em mM: NaCl 140, KCl 4, MgCl_2 1, CaCl_2 1,8, glucose 10, HEPES 5, pH 7,4; Os miócitos foram subsequentemente carregados com 5 μM Fluo-4 AM (Molecular Probes, Eugene, OR) em NT durante 10-20 min. Os miócitos foram colocados em placas de vidro (25x40-1) revestido com laminina (Life Technologies, diluída 1:1 com solução tampão contendo 10 mM de Tris, 1 mM de EGTA, pH 7,4). O indicador Fluo-4 foi excitado a 488 nm com fluorescência medida a > 500 nm usando um microscópio confocal BioRad (Bio-Rad Microradiance 2000)⁴. Para medir os níveis de Ca^{2+} no citosol e núcleo⁵¹, o plano confocal foi ajustado para o meio (eixo-z) dos núcleos, garantindo que apenas a fluorescência proveniente do nucleoplasma fosse coletada. Uma linha de varredura de 512 pixels foi posicionada para incluir o núcleo e digitalizada a cada 2 ms. As linhas de

varredura consecutivas foram empilhadas ao longo do tempo e visualizadas como uma imagem 2D. Os miócitos foram estimulados eletricamente a 0,5 Hz, 30 volts, duração de pulso de 2 ms usando um par de eletrodos de platina. Depois, as células foram incubadas a 100 nM de angiotensina (5 minutos), 100 nM aldosterona (5 minutos) ou 100 nM de isoproterenol (1 minuto) de acordo com os grupos para aquisição dos dados. Logo após a incubação, foi selecionado uma linha, que passava medialmente pelo núcleo e citoplasma da célula de forma simultânea para registro dos dados. Os parâmetros de transientes de Ca^{2+} foram relatados como razão de intensidade de fluorescência (F/F_0), onde F_0 é a fluorescência em repouso da célula e F quando excitada pelo laser. Amplitude, Tempo de Pico (TTP), tempo de decaimento de 50% (TD50) de transientes de Ca^{2+} foram obtidos a partir dos traçados registrados. A contratilidade foi mensurada pelo mesmo confocal através do sistema de detecção de bordas analisados pelo software de processamento de imagem disponível gratuitamente, o Image J. A análise inclui parâmetros gerais de imagem e parâmetros individuais⁹⁶⁻⁹⁸.

3.9 Estudo da Função Vascular

3.9.1 Animais Experimentais

Para a realização desta pesquisa foram utilizados no total 40 animais machos, sendo 20 ratos wistar (*Rattus norvegicus albinus*) e 20 wistar espontaneamente hipertensos (SHR), com três meses de idade, provenientes do Biotério do Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas da Universidade Federal do Espírito Santo (CCS – UFES). Os ratos SHR são caracterizados como modelo de hipertensão arterial crônica determinada geneticamente (OKAMOTO; AOKI, 1963)⁸⁸. Sendo amplamente utilizados para investigações sobre os efeitos da hipertensão devido às semelhanças da hipertensão arterial humana essencial primária. Os animais foram mantidos no biotério de origem sob as seguintes condições: gaiolas de polipropileno com tampas de arame cromado forradas com maravalha de Pinus esterilizada, temperatura ambiente ($24 \pm 2^\circ\text{C}$), umidade controlada ($55 \pm 5\%$), ciclos de iluminação de 12 horas e livre acesso a água e a ração e mantidos em gaiolas coletivas. O uso e cuidado dos animais experimentais, estão de acordo com os

princípios éticos da pesquisa com animais. Todos os experimentos foram conduzidos em concordância com a Diretriz Brasileira para o Cuidado e a Utilização de Animais para Fins Científicos e Didáticos (CONCEA-MCT, 2013). Todos os protocolos experimentais foram encaminhados para avaliação do Comitê de Ética em Experimentação e Uso de Animais da Universidade Federal do Espírito Santo (CEUA-UFES).

3.9.2 Pletismografia de Cauda

A Pressão Arterial Sistólica (PAS) foi aferida indiretamente pelo método de pletismografia de cauda (IITC Life Science– 23924 Victory Blvd, Woodland Hills, CA). Os animais foram submetidos a um período de aclimatação de 3 dias, com intuito de diminuir o estresse e conseqüentemente amenizar as possíveis interferências ambientais durante o momento de obtenção dos registros pressóricos. No dia do registro os animais foram colocados em um contentor cilíndrico de acrílico onde permaneceram por 5 a 15 min. A cauda dos animais era conectada ao manguito inflável dotado de sensor de fluxo que por sua vez estava conectado ao amplificador e este ao computador, para obtenção dos dados pressóricos. Os cilindros com os ratos eram colocados no interior de um aparato que promovia um ambiente escuro e aquecido a 33 °C, a fim de promover dilatação da artéria caudal permitindo a aferição da PAS. A média aritmética de três ou mais medidas foi utilizada. As pulsações arteriais foram registradas em um sistema de aquisição de dados computadorizados (AcqKnowledge® MP100, Biopac Systems, Inc. Santa Bárbara, CA, USA).

3.9.3 Reatividade vascular em anéis de aorta torácica

Os animais foram anestesiados com cloridrato de ketamina (50 mg/kg/ip; Dopalen®, Sespo Indústria e Comércio Ltda - Divisão Vetbrands, Jacareí, São Paulo, Brasil) e cloridrato de xilazina (10 mg/kg/ip; Anasedan®, Sespo Indústria e Comércio Ltda - Divisão Vetbrands, Jacareí, São Paulo, Brasil). Após os animais serem devidamente anestesiados e eutanasiados, eles foram submetidos à toracotomia mediana, onde as artérias torácica descendente

forma rapidamente e cuidadosamente removidas e imersas em uma placa de Petri, contendo solução de Krebs-modificado, composta por (em mM): NaCl 127; KCl 4,7; CaCl₂.2H₂O 2,5; MgSO₄.7H₂O 1,2; KH₂PO₄ 1,17; NaHCO₃ 24; Glicose 11; EDTA 0,01. Após a retirada do tecido conectivo e adiposo, a aorta torácica foi dividida em segmentos cilíndricos de aproximadamente 4 mm de comprimento. Cada anel foi colocado em cubas contendo aproximadamente 5 ml de solução de Krebs-Henseleit previamente aquecida a $36 \pm 0,5$ °C, e gaseificada com mistura carbogênica, mantendo o pH estável em 7,4. Por esse anel, dois fios de aço inoxidável, em forma de triângulos eram passados através do lúmen dos segmentos, ficando paralelos na luz do vaso. Um fio foi fixado à parede do banho e o outro conectado verticalmente a um transdutor de tensão isométrica. Assim, qualquer alteração na tensão do vaso era mensurada por meio de um transdutor de força, conectado a um sistema de aquisição de dados (MP 100 Biopac Systems, Inc; CA) e este a um computador. Após a montagem, os anéis aórticos foram submetidos a uma tensão de repouso de $1 \pm 0,1$ g, reajustada, quando necessário, durante 40 minutos de estabilização. Após o período de estabilização, era adicionado ao banho um volume de 125 µl de KCl 75 mM, para avaliar a atividade contrátil do músculo liso vascular. Quando os anéis atingiam o dobro da força basal (2 g), lavava-se por três vezes com solução de Krebs-Henseleit até retornar a tensão basal (1 g). Após 30 minutos de estabilização, era adicionado novamente ao banho 125 µl de KCl 75 mM, para avaliar a contração máxima do músculo liso vascular, aguardando-se 30 minutos para estabilização. Em seguida, os segmentos eram novamente lavados por três vezes para atingir a tensão basal, e com mais 30 minutos de estabilização, submetidos à avaliação da integridade funcional do endotélio. Para comprovar a integridade endotelial, as artérias eram pré-contraídas com uma concentração de fenilefrina (FE) 10^{-7} M, ou, quando necessário, adicionado soluções mais concentradas até atingir de 60 a 70% da contração do KCl produzida pela solução de Krebs-Henseleit com KCl 75 mM, posteriormente, o relaxamento vascular era obtido por exposição a 10^{-5} M de acetilcolina (ACh). Foram utilizadas nesse estudo as artérias com relaxamento superior a 80 % da contração induzida pela FE quando os anéis tinham endotélio preservado e de somente 20% de relaxamento, quando os endotélios foram removidos.

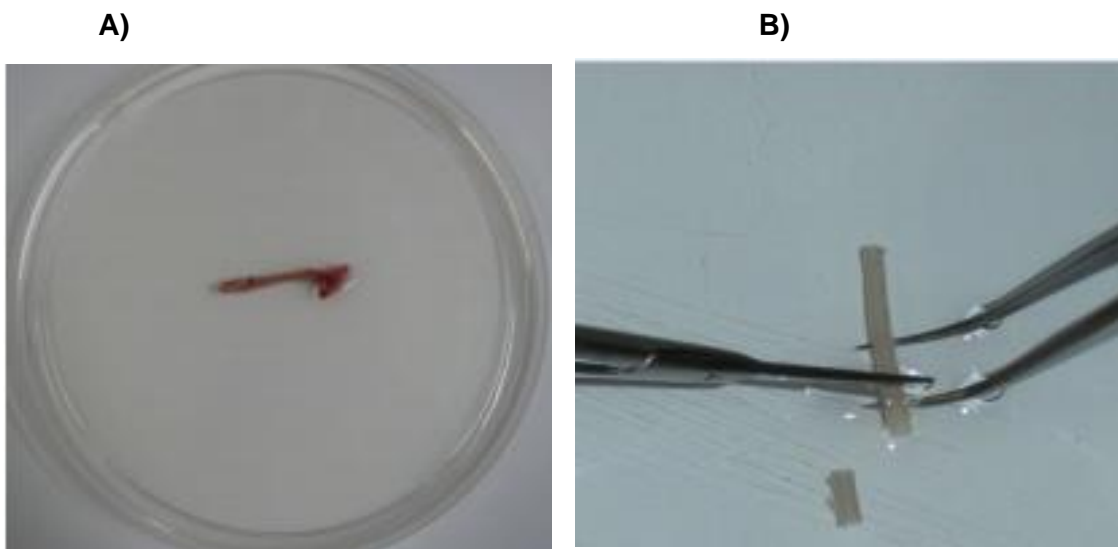


Figura 7. (A) Aorta torácica imersa em uma placa de Petri contendo solução de Krebs e tecido conectivo e adiposo; (B) Após a retirada dos tecidos e sendo dividida em segmentos cilíndricos de aproximadamente 4 mm (Angeli, 2009).

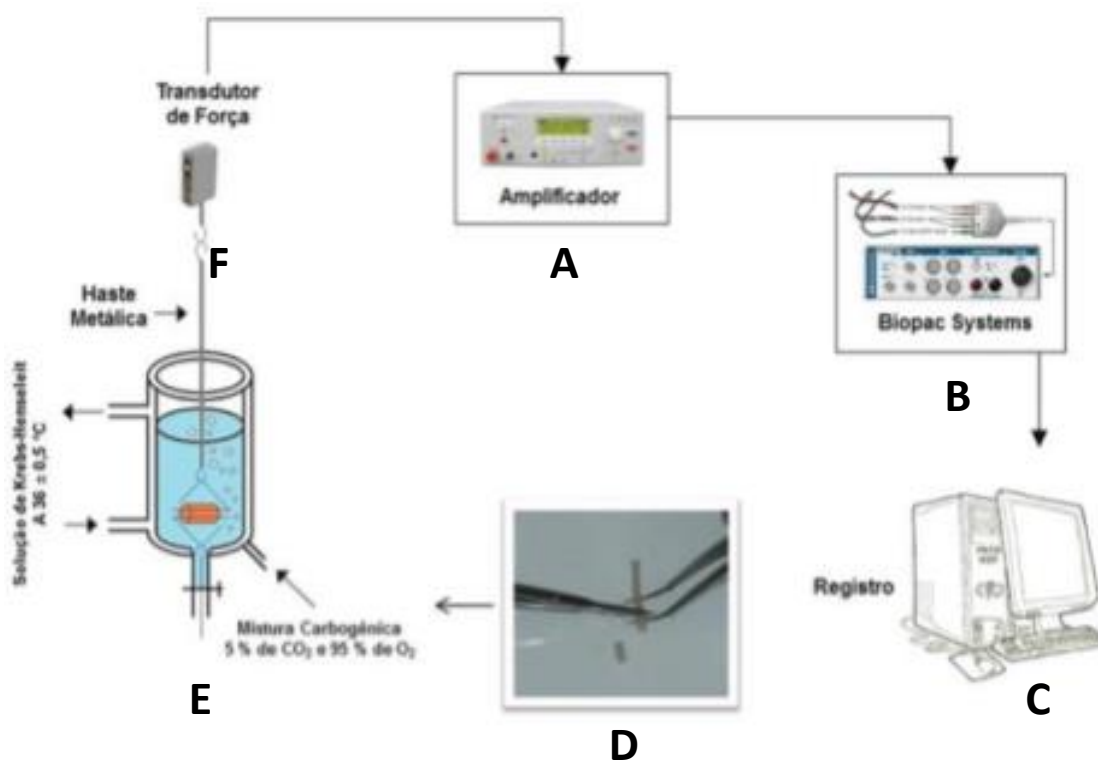


Figura 8. Esquema ilustrativo da preparação dos anéis de aorta para a avaliação da reatividade vascular (*in vitro*). Em A temos o amplificador utilizado para aumentar um sinal elétrico recebido; B - sistema Biopac para análise de dados flexível e eficiente na área da

pesquisa; C – computador, aonde são armazenado os dados; D - anel de aorta limpo de tecido conectivo e adiposo com aproximadamente 4mm; E - cuba contendo mistura carbogênica (5% de CO₂ e 95% O₂), solução de Krebs modificada conforme descrito acima, haste metálica para tensionar a artéria e na letra F, transdutor de força utilizado para medir a tensão exercida no tecido (Modificado de Nunes, 2014)¹⁰⁰.

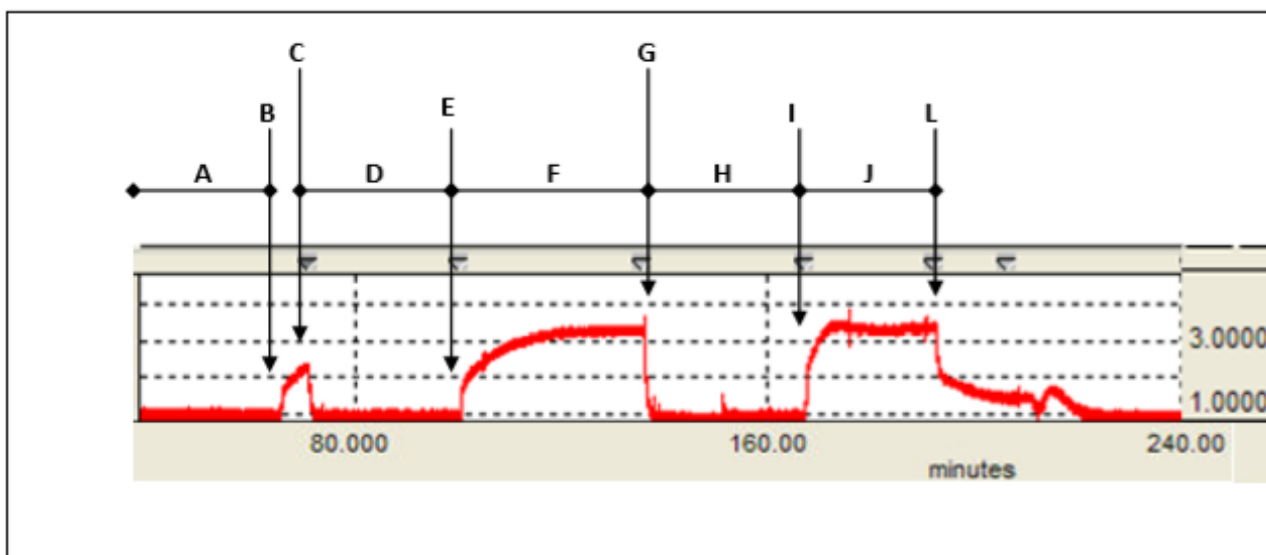


Figura 9. Esquema com registro de curvas, representando o teste da viabilidade do músculo liso vascular com KCl e avaliação da integridade funcional do endotélio. Avaliação da viabilidade do músculo liso vascular com KCl: A) Período de estabilização inicial (45 min permanecendo na tensão de $1 \pm 0,1$ gramas); B) Adição de 125 μ l de KCl a uma concentração de 75 mM no banho; C) Lavagem dos anéis por 3 vezes com solução Krebs-Henseleit; D) Período de estabilização (30 min); E) Adição de 125 μ l de KCl a uma concentração de 75 mM no banho; F) Platô da contração induzida pelo KCl (75 mM); G) Lavagem dos anéis com solução Krebs-Henseleit; H) Período de estabilização (30 min). Avaliação da integridade funcional do endotélio: I) Pré-contração com fenilefrina (Fe) 10^{-7} M; J) Platô da contração induzida pela Fe; L) Adição de acetilcolina (ACh) 10^{-5} M. O tempo foi registrado em minutos, eixo horizontal (intervalo de 80 min) e a força em gramas (g), eixo vertical. (Dias, 2007)¹⁰¹.

Já para avaliar a resposta independente do endotélio vascular, os anéis eram submetidos à remoção mecânica desta camada com o auxílio de uma haste de aço inoxidável, que cuidadosamente inserida na luz do vaso e friccionada à sua íntima em uma única direção por dez vezes com uma força

pequena aplicada sobre a falange distal por uma distância de aproximadamente 2 cm.

3.9.4 Protocolos experimentais

3.9.5 Resposta vasodilatadora dependente e independente do endotélio

Para análise da função vasodilatadora dependente do endotélio foi avaliado o relaxamento induzido pela acetilcolina (10^{-5} M). Os anéis de aorta com endotélio foram previamente contraídos com fenilefrina 10^{-7} M até atingir de 60 a 80% da contração do KCl. Já para análise independente do endotélio, foi permitida uma contração máxima de 20% da contração do KCl.

3.9.6 Resposta vasoconstritora à fenilefrina

Após a avaliação da integridade funcional do endotélio, a solução nutritiva do banho foi trocada três vezes para que a tensão basal fosse normalizada. Após 30 minutos de estabilização foi realizada a curva concentração-resposta à fenilefrina (10^{-10} a 3×10^{-4} M) de maneira cumulativa - com a finalidade de avaliar a capacidade do endotélio em modular a resposta constritora à fenilefrina, um agonista seletivo do receptor adrenérgico alfa 1. Foram utilizados nos protocolos experimentais anéis de aorta com endotélio íntegro e sem endotélio (E-).

Todos os protocolos de reatividade vascular, a partir deste momento, foram realizados da seguinte forma: após o teste de viabilidade da aorta e dos 30 minutos de estabilização, foram feitas curvas com doses cumulativas de fenilefrina.

Com a finalidade de estudar a participação da PKD1 sobre a reatividade vascular, os anéis de aorta foram incubados previamente com CID - Inibidor

seletivo e específico da PKD1; utilizando a concentração de 3,2 μM (IC50) para inibição da PKD1, e em associação com diferentes compostos de acordo com a via a ser estudada. Entre eles, o L-NAME (NG-nitro-L-arginina metil éster 0665; 100mg; $\text{C}_7\text{H}_{15}\text{N}_5\text{O}_4\cdot\text{HCl}$) na concentração de 100 μM - um inibidor não-seletivo da enzima óxido nítrico sintase (NOS), o composto 1400W - um potente inibidor e altamente seletivo da iNOS na concentração de 1 μM e N^ω cloridrato-propil-L-arginina, a uma concentração de 0,5 μM (10 vezes o IC50), (N5-[Imino(propylamino)methyl]-L-ornithine hydrochloride, Inibidor altamente seletivo e potente da nNOS ($K_i = 57 \text{ nM}$) apresentando seletividade 3158 vezes e 149 vezes maior que sobre a iNOS and eNOS respectivamente, Kakok et al 2001; Zhang et al 1997). Todos esses fármacos foram adquiridos do laboratório TOCRIS a biotechne brand ®.

3.9.7 Modulação da reatividade vascular induzida pela angiotensina II

Após a avaliação da integridade funcional do endotélio, a solução nutritora do banho foi trocada três vezes para que a tensão basal fosse normalizada. Após 30 minutos de estabilização foi realizada a curva concentração-resposta à angiotensina II (1158; 5 mg; $\text{C}_{50}\text{H}_{71}\text{N}_{13}\text{O}_{12}$; TOCRIS a biotechne brand ®) a uma concentração de 10^{-5} a 10^{-10} M. Sendo utilizado os mesmos fármacos descritos anteriormente na curva de fenilefrina.

4. Análise estatística

Os resultados estão expressos como média \pm erro padrão da média (EPM). As respostas contráteis à fenilefrina e ao KCl foram expressas em gramas de contração (g). As análises estatísticas desses dados foram realizadas por teste t, pareado e/ou não pareado, com análise de variância (ANOVA), uma via, para medidas repetidas ou completamente randomizada, seguida pelo teste *post-hoc* de Tukey. Valores de $p < 0,05$ serão considerados estatisticamente significativos. Foi utilizado o software Image J (<http://rsb.info.nih.gov/ij/>) para análises com a intensidade das regiões de interesse normalizadas para área.

5. Resultados

5.1 Sinalização da via PKD1 no núcleo, citoplasma, mitocôndria em cardiomiócitos ventriculares de coelhos.

Na figura 10, podemos observar os resultados da avaliação radiométrica, em tempo real, da atividade da PKD1 no núcleo, citoplasma e mitocôndria dos cardiomiócitos após utilização da angiotensina II, aldosterona e salina para o grupo controle. Pode-se perceber que os repórteres ativadores de quinase D (DKARs) no núcleo, apresentaram valores mais elevados ao tratamento feito pela aldosterona, ao passo que quando, analisamos o citoplasma e a mitocôndria, foi observada atuação da angiotensina II de forma mais significativa.

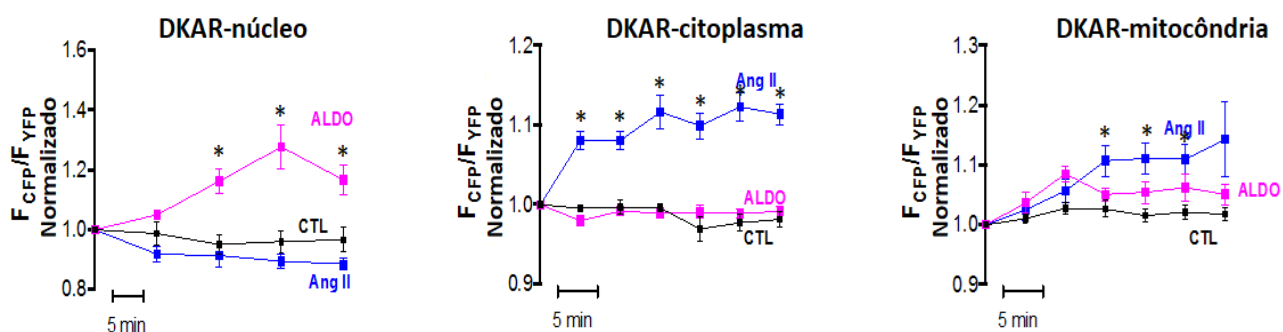


Figura 10. Medida, em tempo real, da atividade da PKD1 no núcleo, citoplasma e mitocôndria dos cardiomiócitos. Foi utilizado como forma de tratamento agudo: angiotensina II, aldosterona e salina, * $p < 0,05$ versus controle.

5.2 Avaliação do transiente de cálcio em miócitos ventriculares de camundongos de linhagem C56BL6 em condição basal, em células PKD WT vs PKD KO.

Os resultados apresentados na figura 11, demonstram a análise de quantificação do cálcio nuclear (linha vermelha) e citosólico (linha preta) dos miócitos. Essas mensurações (registro original em verde, painel superior) onde temos a célula do animal controle PKD WT e do animal PKD KO. Pode ser visto, o local de passagem do laser (citosol e núcleo) marcadas em branco, onde são feitas devidas mensurações. As células se encontram em situação basal, sendo estimuladas eletricamente a uma frequência de 0,5 Hz, 30 volts,

duração de pulso de 2 ms usando um par de eletrodos de platina. Durante as análises, não foram observadas diferenças estatísticas entre os grupos PKD WT vs PKD KO, em relação ao cálcio total e nem em relação aos grupos com e sem tratamento. Os parâmetros avaliados foram: amplitude da cálcio, TTP (tempo para o pico, ms) e CaTD50 (tempo para o pico, ms) e CaTD50 (tempo de decaimento em 50 % do pico, ms).

Traçados representativos da avaliação do transiente de cálcio nos cardiomiócitos isolados

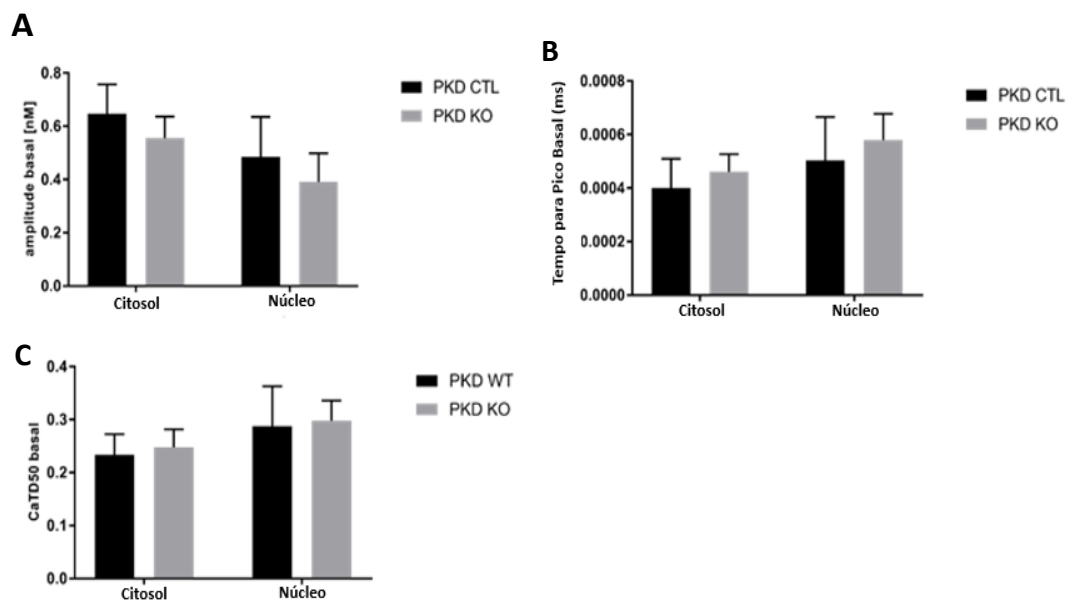
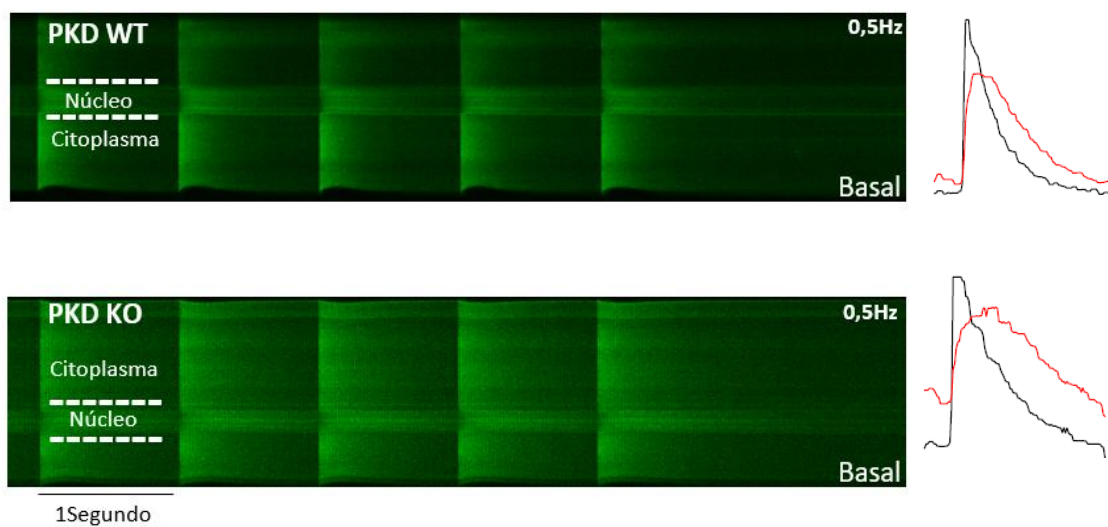


Figura 11. Mensuração simultânea do cálcio no cardiomiócito entre o núcleo (linha vermelha) e o citosol (linha preta) em situação basal e avaliação do transiente de cálcio nos parâmetros: Amplitude do transiente de cálcio, TTP (tempo para o pico, ms) e CaTD50 (tempo de decaimento em 50 % do pico, ms) para os camundongos PKD WT (*wildtype*) e PKD KO (*knockout* para PKD1).

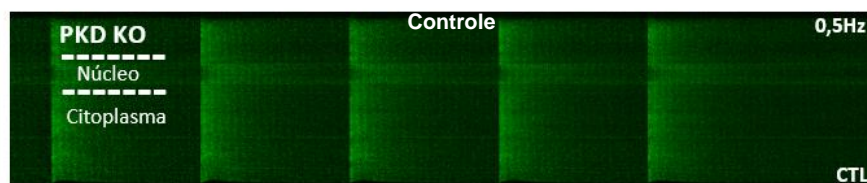
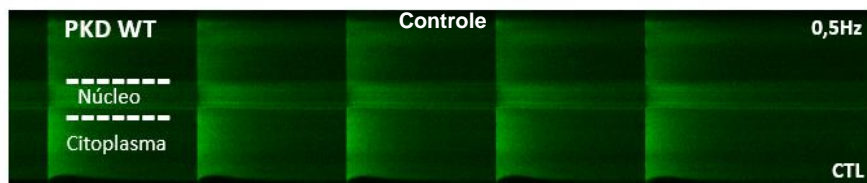
5.3 Avaliação do transiente de cálcio em miócitos ventriculares de camundongos de linhagem C56BL6 com e sem a utilização da angiotensina II em células PKD WT vs PKD KO.

Na figura 12, podemos observar a mensuração do cálcio nuclear e citosólico dos cardiomiócitos, com e sem adição da angiotensina II. Em relação a amplitude do transiente de cálcio, podemos notar que existe aumento do cálcio citosólico total em comparação ao cálcio nuclear total ($p < 0,0001$). Entretanto, quando comparamos os grupos com e sem tratamento, verificamos que os dados não apresentam diferença. Isso pode ser visto também, quando comparamos os animais PKD WT Vs PKD KO.

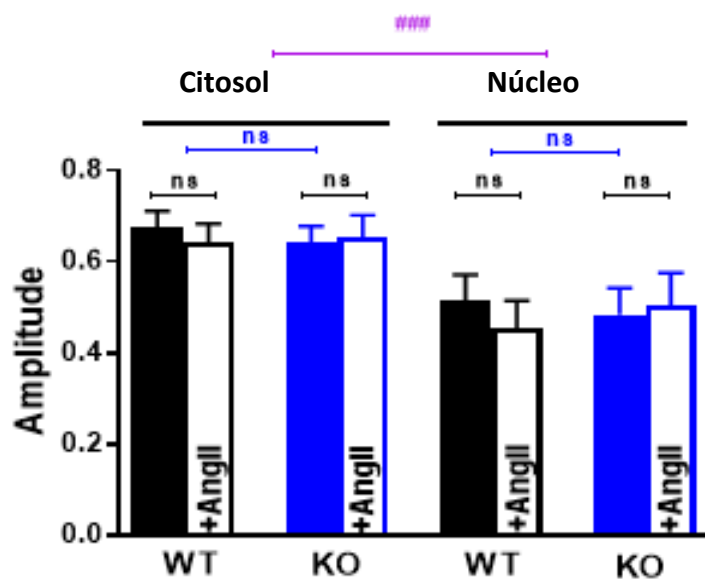
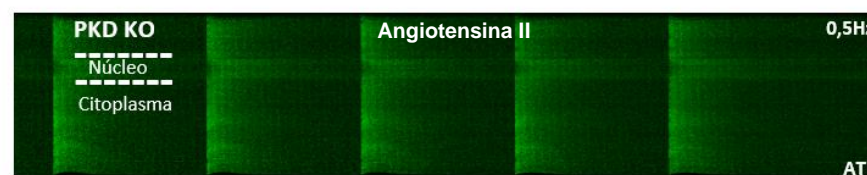
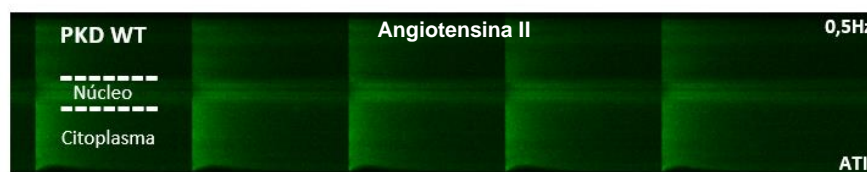
Em relação a TTP, podemos observar, um aumento do cálcio citosólico total em comparação ao cálcio nuclear total ($p = 0,0288$). Foi observado também, um aumento a resposta a angiotensina II nas células dos animais PKD WT quando comparado as células sem tratamento ($p = 0,0049$) no citosol. Ao passo que quando comparado as células do animal PKD KO com e sem tratamento a angiotensina II não foram observadas alterações no citosol. Já quando comparados os grupos PKD WT vs PKD KO com e sem o tratamento da angiotensina II, foi observado um aumento significativo nas células do grupo PKD KO ($p = 0,0034$) no citosol. Em relação ao núcleo, esses parâmetros não apresentaram diferenças estatísticas conforme pode ser visto na figura citada.

No CaTD50, foi observado aumento no cálcio nuclear total ($p = 0,0007$) quando comparado ao cálcio citosólico total. Sendo as outras comparações PKD WT vs PKD KO, com e sem o tratamento a angiotensina II não apresentaram relevâncias significativas.

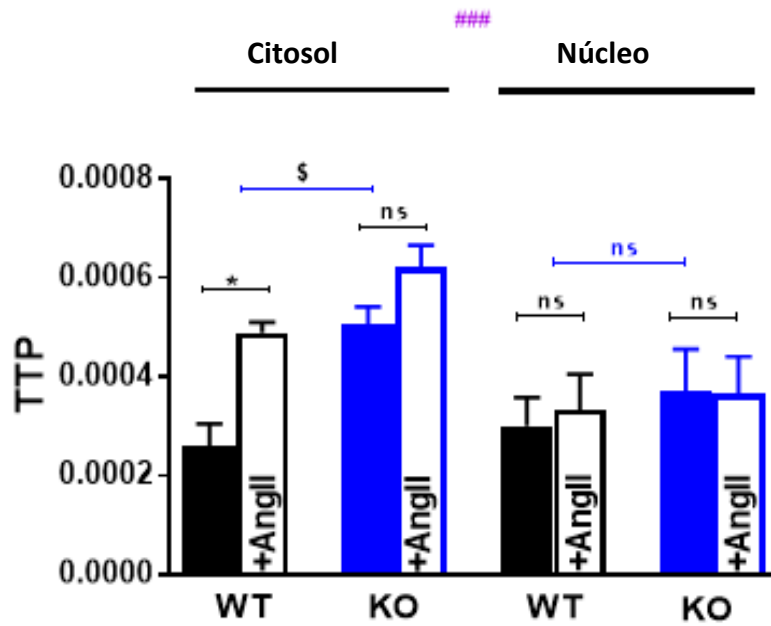
Traçados representativos da avaliação do transiente de cálcio nos cardiomiócitos isolados



1Segundo



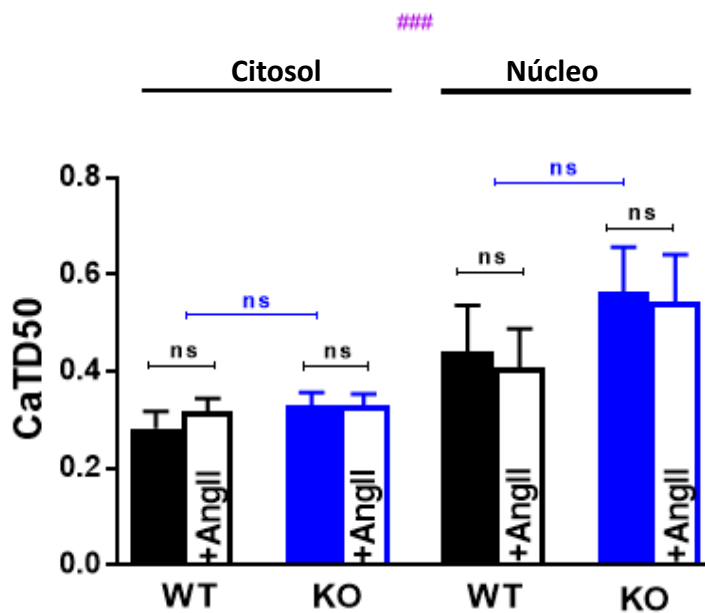
diferença entre Núcleo e o Citosol $P < 0,0001$



*antes e após Angiotensina II $P=0,0049$

diferença entre Núcleo e o Citosol $P=0,0289$

§ comparação entre WT e KO $P=0,0034$



diferença entre Núcleo e o Citosol $P=0,0007$

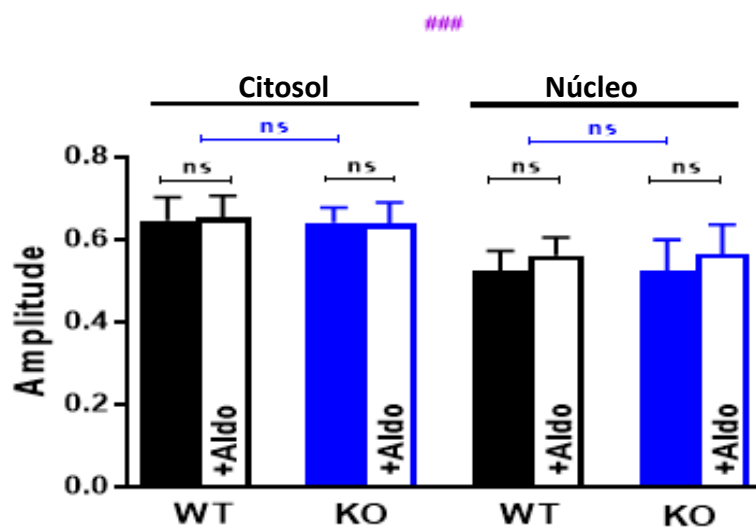
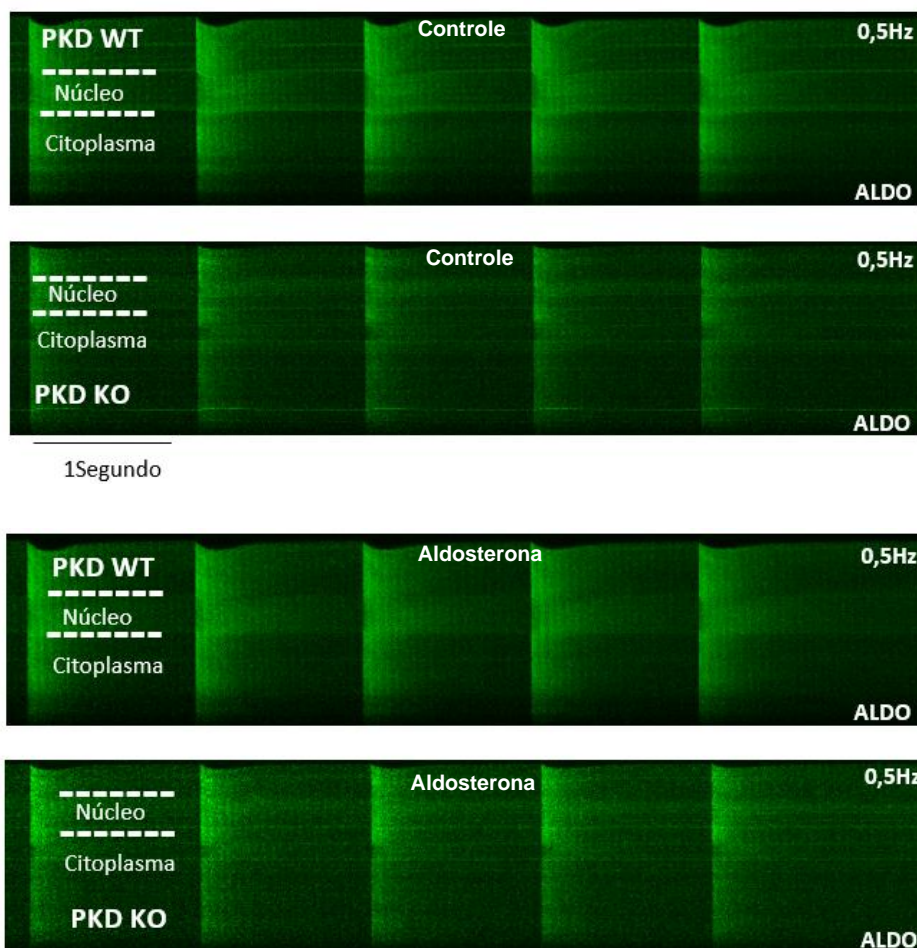
Figura 12. Avaliação do transiente de cálcio antes (Controle) e após incubação com Angiotensina II registrados no núcleo e citosol dos cardiomiócitos isolados, com a membrana celular intacta e estimulados com eletrodos de platina a uma frequência de 0,5 Hz. Avaliação da amplitude do transiente de cálcio, TTP e CaTD50, nos grupos WT (Wistar), KO (Knockout para PKD1). Comparação entre o citosol e o núcleo dos cardiomiócitos ventriculares de camundongos. ns (diferença não significativa), teste t de Student, As análises estatísticas estão indicadas nas figuras.

5.4 Avaliação do Transiente de Cálcio em miócitos ventriculares de camundongos de linhagem C56BL6 com e sem a utilização da aldosterona em células PKD WT vs PKD KO.

A figura 13, representa a mensuração do cálcio nuclear com o citosólico dos cardiomiócitos com e sem adição da aldosterona comparando-os aos animais PKD WT vs PKD KO. Em relação a Amplitude, foi observado um aumento do cálcio citosólico total em comparação ao cálcio nuclear total ($p < 0,0157$). Não foram observadas alterações entre os grupos PKD WT vs PKD KO em relação ao núcleo e citoplasma e ao tratamento nas células com vs sem a adição de aldosterona. Em relação a TTP, pode ser observado, um aumento do cálcio citosólico em comparação ao cálcio nuclear ($p = 0,0021$) total. Já em relação as alterações entre os grupos PKD WT vs PKD KO e a relação ao núcleo e citoplasma em respostas ao tratamento das células com vs sem a adição de aldosterona não foi observado diferenças estatísticas.

No CaTD50, pode ser observado aumento no cálcio nuclear total ($p = 0,0037$) quando comparado ao cálcio citosólico total. Quando comparado a atuação do fármaco nas células de mesmo grupo, tanto WT quanto KO, os resultados não foram significantes. Já quando comparados os grupos PKD WT vs PKD KO no citosol, podemos identificar uma diminuição do efeito da aldosterona nas células dos animais PKD KO e uma significância de $p = 0,0025$. Sendo observado esse mesmo efeito quando comparado esses grupos no núcleo ($p = 0,0025$). Entretanto quando feita as análises entre os mesmos grupos no núcleo, não foram observadas diferenças.

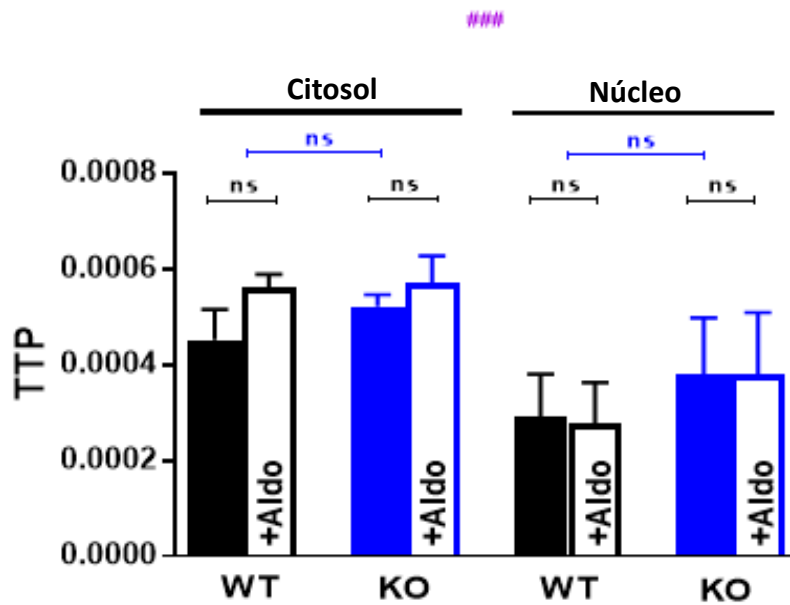
Traçados representativos da avaliação do transiente de cálcio nos cardiomiócitos isolados



* Efeito da Aldosterona

Comparação entre o Núcleo e o Citosol $P=0,0157$

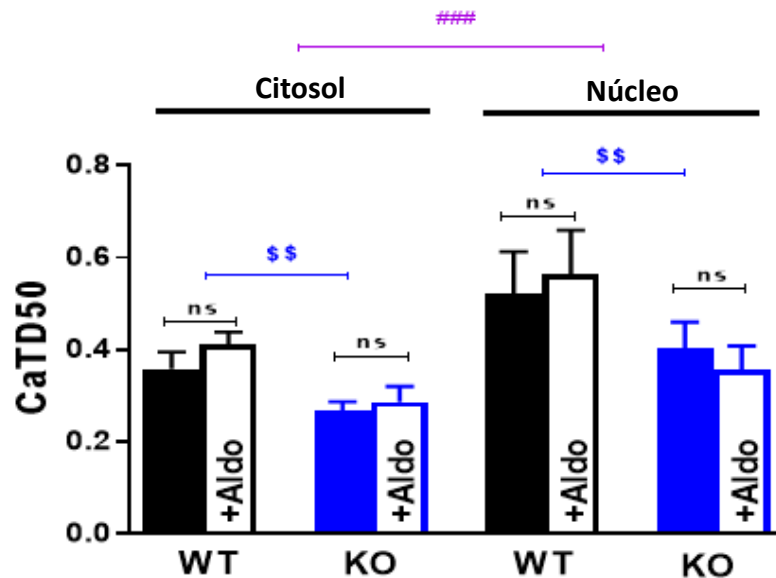
\$ Comparação entre os grupos WT e KO



*Efeito da Aldosterona

Comparação entre o Núcleo e o Citosol $P=0,0021$

\$ Comparação entre os grupos WT e KO



*Efeito da Aldosterona

Comparação entre o Núcleo e o Citosol $P=0,0037$

\$ Comparação entre os grupos WT e KO $P=0,0025$

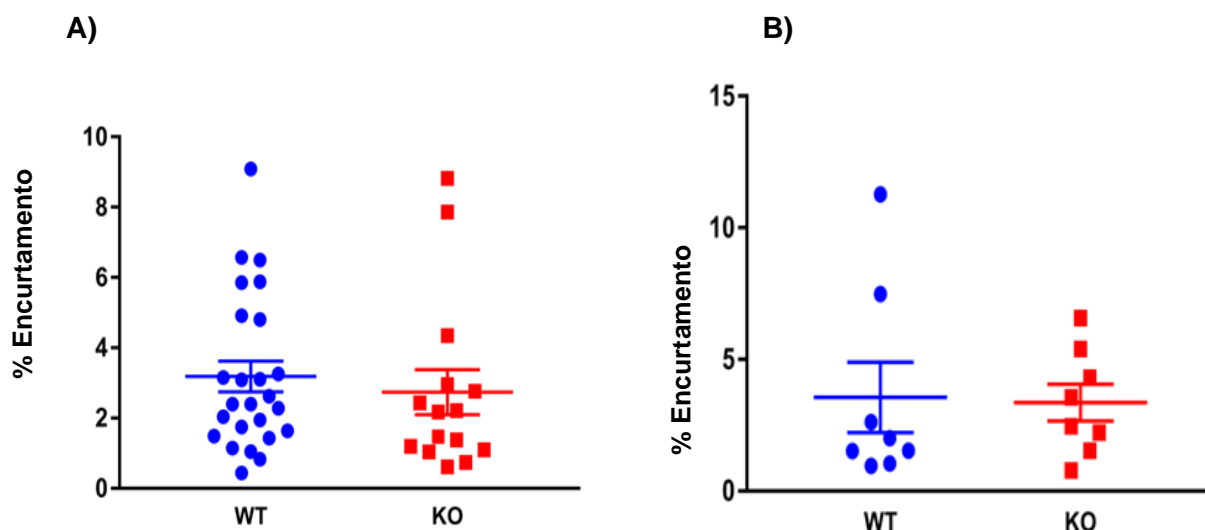
Figura 13. Avaliação do transiente de cálcio antes (Controle) e após incubação com Aldosterona registrados no núcleo e citosol dos cardiomiócitos isolados, com a membrana celular intacta e estimulados com eletrodos de platina a uma frequência de 0,5 Hz. Avaliação da amplitude do transiente de cálcio, TTP e CaTD50, nos grupos WT (Wistar), KO (Knockout para PKD1). Comparação entre o citosol e o núcleo dos cardiomiócitos ventriculares de camundongos. ns (diferença não significativa), teste t de Student, As análises estatísticas estão indicadas nas figuras.

5.5 Avaliação do Percentual de encurtamento em cardiomiócitos PKD WT vs PKD KO e do retículo através do uso de cafeína.

Na figura 14 abaixo, podemos avaliar o percentual de encurtamento dos miócitos ventriculares de camundongos de linhagem C56BL6, com e sem a adição de agentes farmacológicos como: angiotensina II, aldosterona, isoprotrenol e cafeína.

Foram analisadas 25 células de animais PKD WT vs 15 células de animais PKD KO. Podemos verificar que não houve diferenças entre os grupos. Já em B, foi feita a adição da aldosterona para avaliação do percentual de encurtamento dos miócitos. Foram utilizadas 7 células de animais PKD WT vs 7 células de animais PKD KO, não apresentando diferenças entre os grupos. Na letra C, foi adicionado as células cardíacas angiotensina II. A avaliação do percentual de encurtamento dos miócitos não apresentou diferenças estatísticas. Foram utilizadas 8 células de animais PKD WT vs 8 células de animais PKD KO. Na letra D foi adicionado o isoproterenol, fármaco utilizado como estimulador do sistema beta adrenérgico. Foi utilizado 8 células de animais PKD WT vs 7 células de animais PKD KO.

Não foram identificadas diferenças entre os grupos. Já na letra E, com intuito de avaliar a atuação do retículo sarcoplasmático, foi utilizado a cafeína, que tem como função, fazer a abertura do retículo para que o cálcio saia de forma integral. Foram utilizadas 12 células de animais PKD WT vs 22 células de animais PKD KO. Não foram encontradas diferenças entre os grupos.



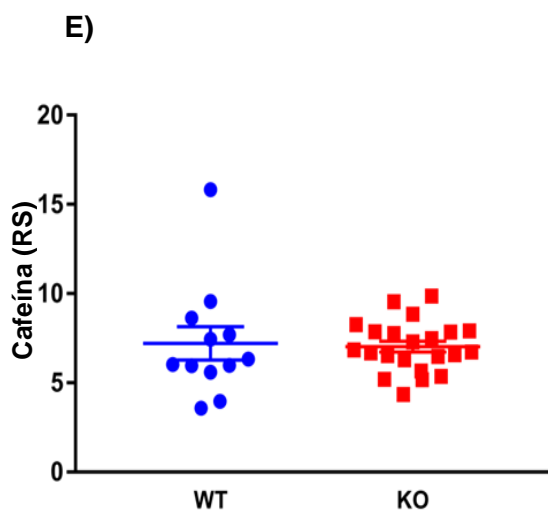
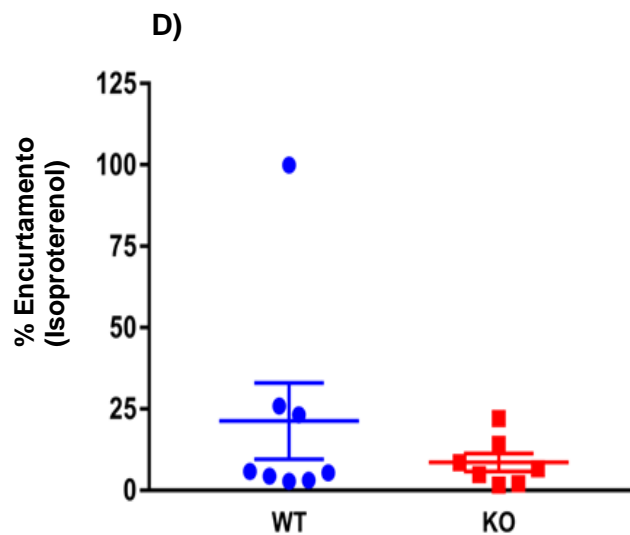
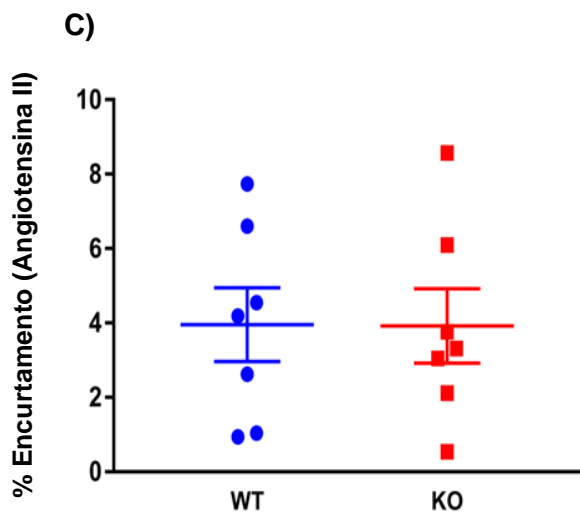


Figura 14. Percentual de encurtamento PKD WT vs PKD KO total. A) Sem tratamento; B) Aldosterona; C) Angiotensina II; D) Estímulo Beta-adrenérgico com isoproterenol e E) Cafeína para avaliação da extrusão do cálcio do retículo sarcoplasmático (RS)

5.6 Dados gerais dos animais Wistar vs SHR

Na Tabela 1 estão demonstrados os valores de pressão arterial sistólica (PAS), frequência cardíaca (FC) e peso corporal (PC) dos animais Wistar e SHR. O peso corporal foi menor no grupo SHR. A pressão arterial sistólica, medida usando o pletismógrafo de cauda, foi maior no grupo SHR. A frequência cardíaca não apresentou diferença estatisticamente significativa entre os grupos.

Tabela 1. Características gerais.

Variáveis	Grupos	
	Wistar (WT)	SHR
PC g	309,3 ± 4,9	256,8 ± 4,5*
PAS mmHg	125,8 ± 1,2	204,8 ± 4,0*
FC (bpm)	327,8 ± 6,4	356,7 ± 17,1

Dados expressos como média ± desvio-padrão. PC: peso corporal; PAS: pressão arterial sistólica; FC: frequência cardíaca: grupo Wistar (WT) e grupo Hipertenso (SHR); Teste "t" de Student para amostras independentes. * p<0,05 WT vs SHR.

5.7 Reatividade a fenilefrina em anéis isolados de aorta em animais normotensos versus SHR na presença e ausência do bloqueador da PKD (CID).

Durante os experimentos realizados podemos observar que a fenilefrina aumentou a resposta contrátil, de maneira concentração-dependente, nos anéis isolados de aorta de todos os grupos estudados. Na figura 15, foi observado que a resposta contrátil em doses crescentes de fenilefrina não foram modificadas quando a PKD foi inibida com o CID. No grupo SHR, podemos identificar uma redução significativa da resposta contrátil no grupo incubado com CID quando comparado ao grupo CT (Fenilefrina $10^{-3,5}$ M; CT = $116,6 \pm 13,5$ vs CID $60 \pm 14,6$ %, p<0,01). Estes dados sugerem a participação da via da PKD, na resposta contrátil induzida pela fenilefrina, no grupo SHR.

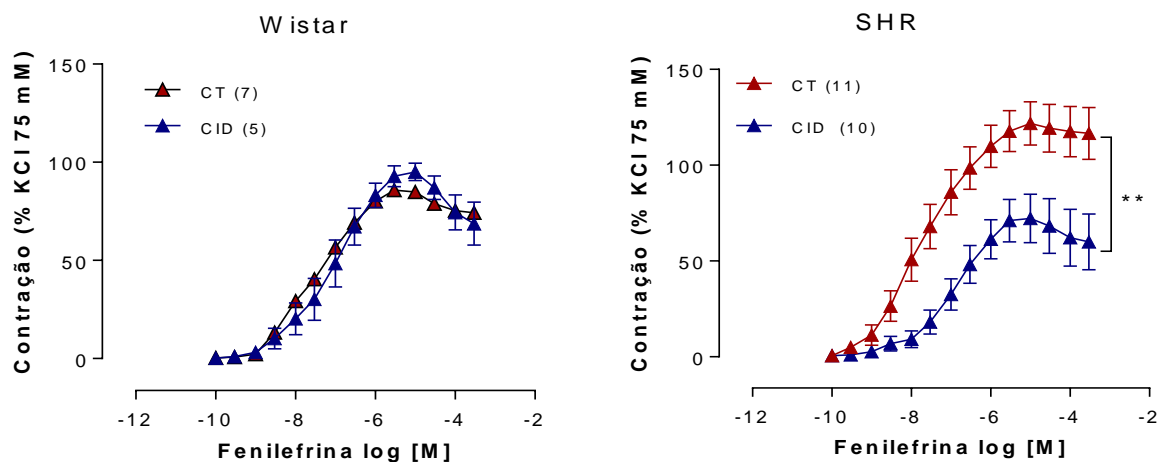


Figura 15. Atuação da PKD sobre a reatividade vascular em aortas. Curva concentração resposta à fenilefrina nos grupos Wistar e SHR. Os dados são expressos como média \pm SEM. ANOVA one way, post hoc Tukey (** $p < 0,01$). Os números de anéis de aorta estão indicados entre parênteses.

Na figura de número 16, podemos observar que a remoção mecânica do endotélio vascular, proporcionou um aumento da responsividade a fenilefrina em relação aos anéis com endotélio nos grupos Wistar (Fenilefrina $10^{-4,5}$ M; CT = $78,8 \pm 11,9$ vs CID $60 \pm 14,6$ %, $p < 0,01$) e SHR (Fenilefrina $10^{-3,5}$ M; CT = $116,5 \pm 13,5$ % vs E- CT $212,0 \pm 34,2$ % $p < 0,01$). No entanto, a inibição da PKD, com CID, não modificou esta resposta no grupo Wistar. Já nos animais SHR, podemos observar que a inibição da via da PKD foi capaz de reduzir o aumento da contração induzida pela fenilefrina, tanto na presença quanto na ausência do endotélio vascular (Fenilefrina $10^{-3,5}$ M; CID = $60,0 \pm 14,5$ % vs E-CID $144,6,0 \pm 9,5$ %, $p < 0,01$). Estes dados demonstram que, no grupo SHR, a via da PKD, modula a resposta a fenilefrina, na presença e na ausência do endotélio vascular. Diferente do que ocorreu com o grupo Wistar, onde a inibição da via da PKD, não modificou a resposta a fenilefrina, mesmo após a retirada do endotélio vascular.

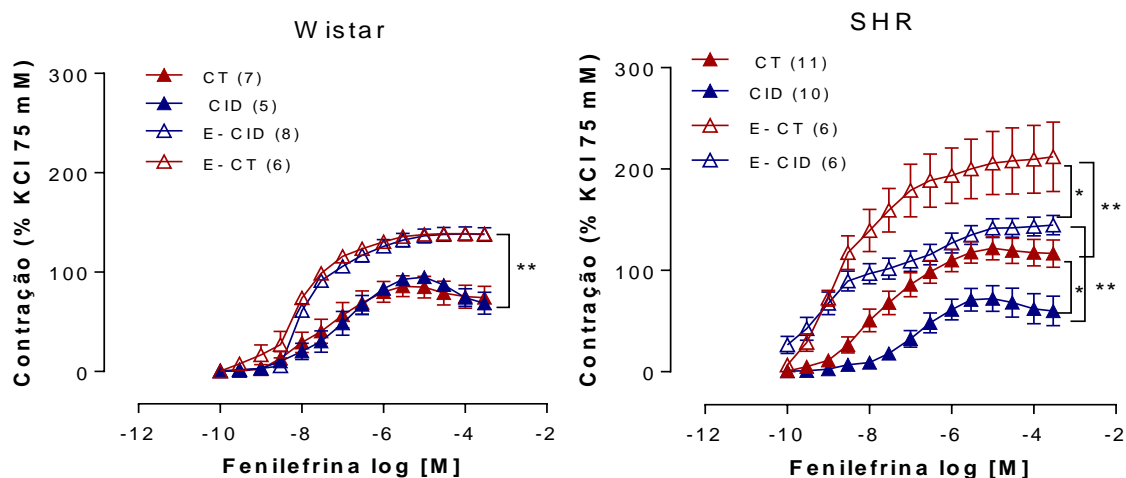


Figura 16. Atuação da PKD sobre a reatividade vascular em aortas. Curva concentração resposta à fenilefrina e modulação endotelial. Ausência do endotélio (E-). Os dados são expressos como média \pm SEM. ANOVA one way, post hoc Tukey (* $p < 0,05$ e ** $p < 0,01$). Os números de anéis de aorta estão indicados entre parênteses.

Para avaliar a participação do NO na modulação da resposta contrátil à fenilefrina, incubamos os anéis de aorta com L-NAME (100 μ M), um inibidor não seletivo da NOS, por 30 minutos, conforme mostrado na figura 17. A incubação com L-NAME aumentou a resposta contrátil à fenilefrina em apenas no grupo Wistar. A inibição da PKD reduziu o aumento na resposta contrátil a fenilefrina na presença e de L-NAME sugerindo que na ausência de NO, a via da PKD participa do aumento da contração a fenilefrina.

No grupo SHR, podemos verificar que a incubação L-NAME + CID, quando comparada com a incubação CID, promoveu aumento da resposta constritora (Fenilefrina $10^{-3,5}$ M; L-NAME + CID = $116,3 \pm 13,9$ % vs CID $60,0 \pm 14,5$ %, $p < 0,01$). No entanto, quando comparado os grupos CT Vs LN, essa resposta não apresentou diferença. Estes resultados sugerem que, no grupo SHR, a menor contração a fenilefrina induzida pela inibição da PKD, é dependente da via da NOS.

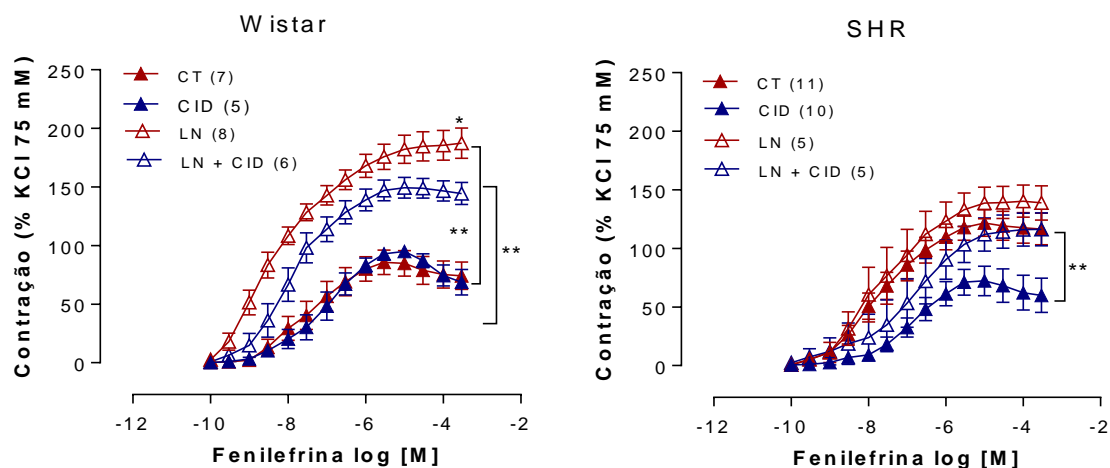


Figura 17. Efeitos da inibição da PKD e da via do NO sobre a reatividade vascular na curva de contração de fenilefrina em anéis de aortas utilizando CID e L-NAME. Os dados são expressos como média \pm SEM. ANOVA one way, post hoc Tukey (* $p < 0,05$ e ** $p < 0,01$). Os números de anéis de aorta estão indicados entre parênteses.

Na figura 18, utilizamos um inibidor seletivo da nNOS (N^{ω} cloridrato-propil-L-arginina 1200) para avaliarmos a modulação da resposta contrátil à fenilefrina nos anéis isolados de aorta. Com o intuito de identificar qual a via da NOS que influencia a resposta da PKD, foi feita a incubação no banho com $100\mu\text{M}$ de inibidor da nNOS, na presença e na ausência de CID. No grupo Wistar, a inibição da nNOS foi capaz de aumentar a resposta contrátil a fenilefrina quando comparada ao grupo CT. A inibição da PKD, usando CID, não modificou essa resposta. No grupo SHR, a inibição da nNOS não modificou a resposta contrátil a fenilefrina. Entretanto, quando a via da PKD foi inibida, com CID, a resposta contrátil a fenilefrina foi amplificada, tornando-se semelhante a resposta observada no grupo controle. Estes resultados sugerem que, no grupo SHR, a queda da contração a fenilefrina induzida pela inibição da PKD, depende da via da nNOS.

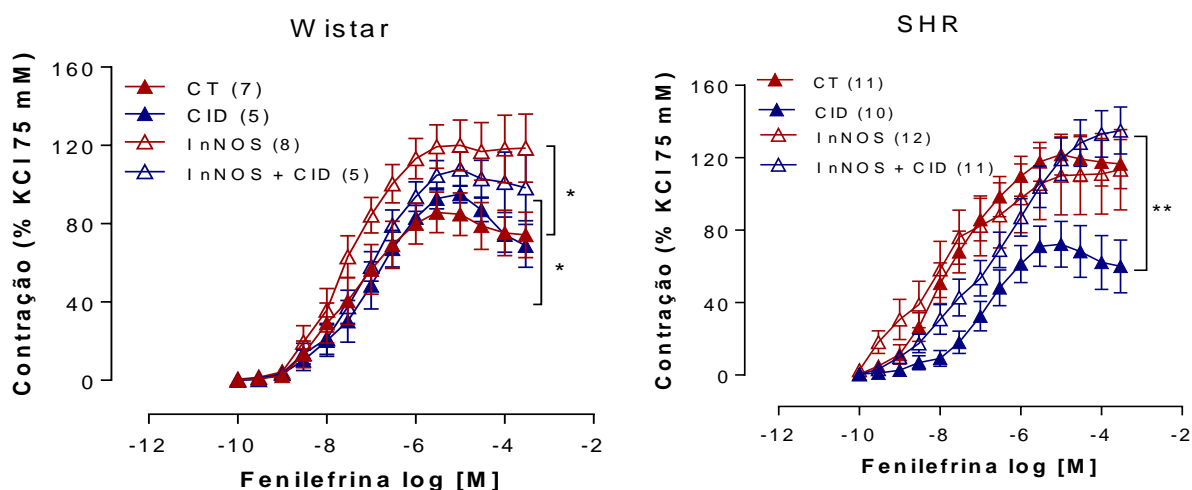


Figura 18. Atuação da PKD sobre a reatividade vascular em aortas. Curva concentração resposta à fenilefrina e modulação endotelial utilizando o inibidor nNOS. Os dados são expressos em (* $p < 0,05$ e ** $p < 0,01$) Os números de anéis de aorta estão indicados entre parênteses.

A figura 19, demonstra os resultados das curvas de contração a fenilefrina antes e após a remoção do endotélio vascular. A remoção do endotélio vascular, proporcionou um aumento da responsividade a fenilefrina quando comparada ao grupo com endotélio em ambos os grupos (Wistar - Fenilefrina $10^{-3,5}$ M; I nNOS + CID = $118,6 \pm 17,4$ vs E- I nNOS + CID $146,3 \pm 7,1$ %, $p < 0,01$) (SHR - Fenilefrina $10^{-3,5}$ M; I nNOS = $140,5 \pm 15,47$ vs E- I nNOS $203,2 \pm 10,3$ %, $p < 0,01$); (SHR - Fenilefrina $10^{-3,5}$ M; I nNOS + CID = $135,0 \pm 12,9$ vs E- I nNOS + CID $240,1 \pm 24,1$ %, $p < 0,05$).

No grupo SHR, a inibição da nNOS não modificou a resposta contrátil a fenilefrina, na presença do endotélio. Entretanto, a retirada do endotélio vascular, elevou a resposta contrátil a fenilefrina, tanto na presença quanto a ausência da inibição da PKD. Estes dados sugerem que a resposta contrátil a fenilefrina, via PKD, não parece ser modificada pela via da nNOS.

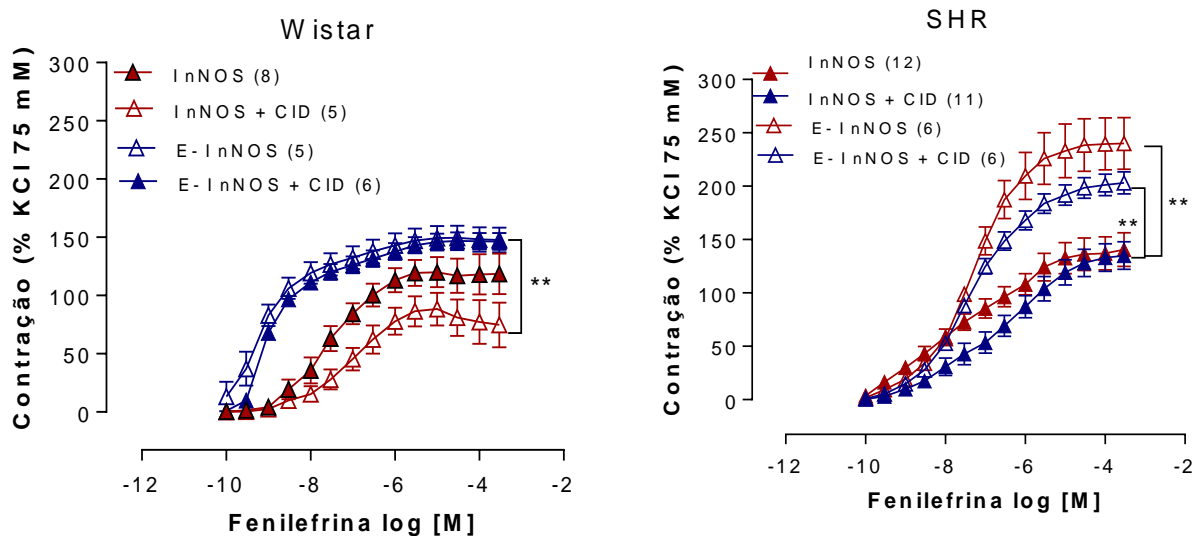


Figura 19. Atuação da PKD sobre a reatividade vascular em aortas. Curva concentração resposta à fenilefrina e modulação endotelial utilizando o inibidor nNOS, sem endotélio (E-) e com endotélio preservado (E+). Os dados são expressos em (** $p < 0,01$) Os números de anéis de aorta estão indicados entre parênteses.

Na figura 20, foi utilizado um inibidor seletivo da iNOS, composto 1400W, para avaliarmos sua participação na via da PKD sobre a resposta contrátil à fenilefrina nos anéis de aorta torácica. No grupo Wistar, a inibição da iNOS, aumentou a vasoconstrição apenas nas doses mais altas de fenilefrina (Fenilefrina $10^{-3,5}$ M; CT = $74,2 \pm 30,6$ vs I iNOS $100,0 \pm 6,2$ %, $p < 0,05$). Nos anéis de aorta dos animais SHR, a inibição da iNOS, modificou a contração a fenilefrina nos grupos controle e CID. Estes resultados sugerem que a via de produção de NO, ativada pela enzima iNOS, não parece influenciar a modulação contrátil, via PKD, durante a contração induzida pela fenilefrina.

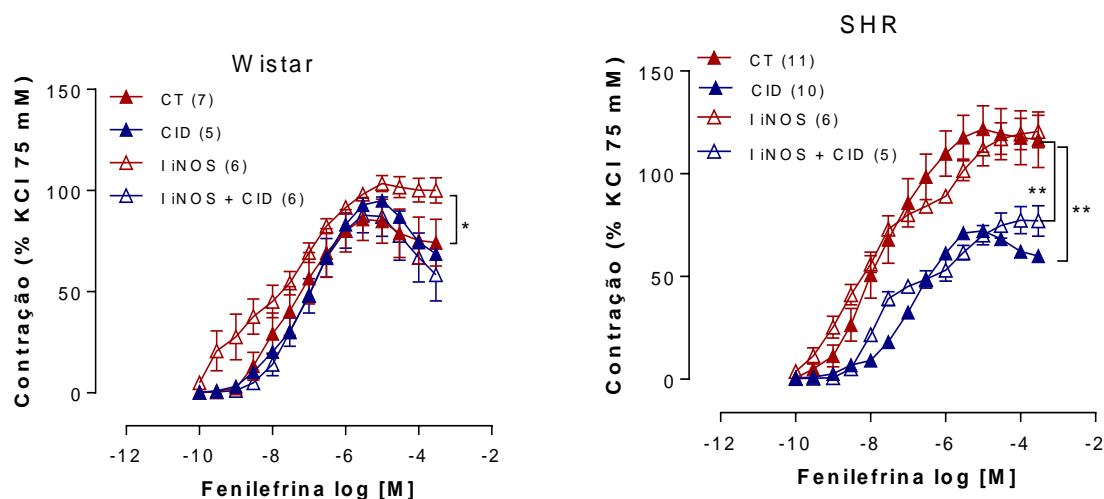


Figura 20. Participação da PKD sobre a reatividade vascular em anéis isolados de aorta. Curva concentração resposta à fenilefrina e modulação endotelial utilizando o inibidor específico da iNOS, composto 1400 W (I iNOS) na presença e ausência do inibidor da PKD (CID). Os dados são expressos como média \pm SEM. ANOVA one way, post hoc Tukey (* $p < 0,05$ e ** $p < 0,01$). Os números de anéis de aorta estão indicado entre parênteses.

Na figura 21, estão apresentados os resultados da avaliação da participação do endotélio vascular sobre a inibição seletiva da iNOS, usando o composto 1400W. Estes experimentos visaram entender o papel do endotélio sobre a participação na via da PKD na resposta contrátil à fenilefrina nos anéis de aorta torácica. No grupo Wistar, como esperado, a retirada do endotélio vascular, aumentou a contração a fenilefrina. Entretanto, na ausência do endotélio vascular, não houve diferença na contração induzida pela fenilefrina, quando a PKD foi inibida. Estes dados sugerem que a modulação da PKD, via enzima iNOS, sobre a resposta contrátil a fenilefrina, depende da presença do endotélio. Este fato é diferente do que ocorreu com o grupo SHR. A remoção do endotélio vascular no grupo SHR, aumentou a resposta contrátil a fenilefrina, na presença e ausência de CID, inibidor da PKD (Fenilefrina $10^{-3,5}$ M; I iNOS = $120,6 \pm 7,9$ vs E- I iNOS $254,6 \pm 15,9$ %, $p < 0,01$; Fenilefrina $10^{-3,5}$ M; I iNOS + CID = $77,0 \pm 7,4$ vs E- I iNOS + CID $205,0 \pm 4,9$ %, $p < 0,01$). Do mesmo modo, a inibição da PKD, foi capaz de diminuir a resposta máxima de contração a fenilefrina. Estes dados sugerem que participação modulatória da PKD, sobre a contração a fenilefrina, ocorre mesmo na ausência do endotélio vascular e da inibição da enzima iNOS.

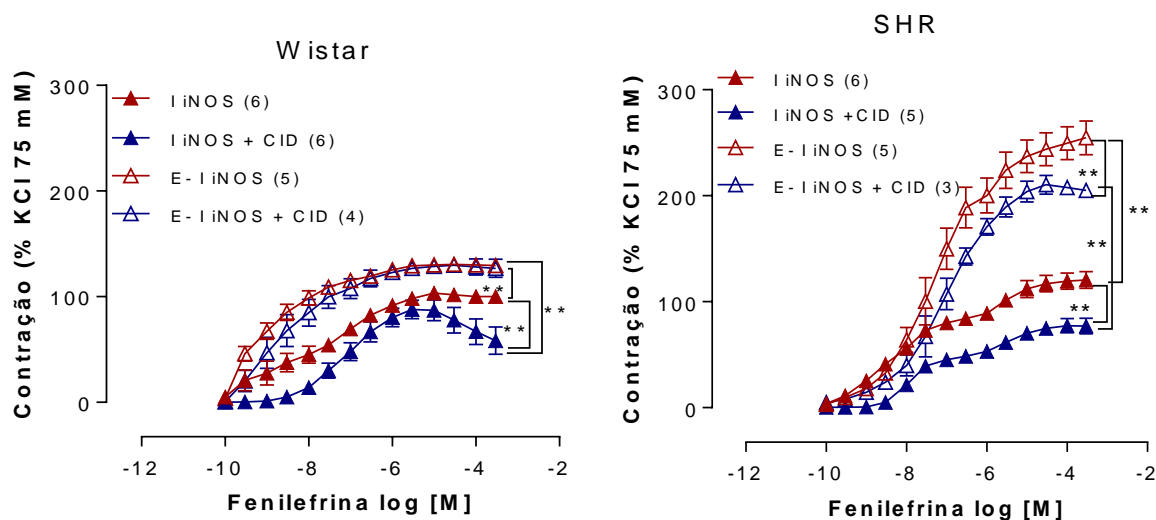


Figura 21. Participação da PKD sobre a reatividade vascular em anéis isolados de aorta com e sem (E-) endotélio vascular. Curva concentração resposta à fenilefrina e modulação endotelial utilizando o inibidor específico da iNOS, composto 1400 W (I iNOS) na presença e ausência do inibidor da PKD (CID). Os dados são expressos como média \pm SEM. ANOVA one way, post hoc Tukey (* $p < 0,05$ e ** $p < 0,01$). Os números de anéis de aorta estão indicados entre parênteses.

5.8 Reatividade vascular em anéis isolados de aorta em animais normotensos e SHR, com e sem a atuação do bloqueador da PKD (CID): Curva concentração resposta à angiotensina II.

Estes experimentos foram realizados com o intuito de investigar se a enzima PKD modula a regulação vascular pela angiotensina II, em ratos normotensos e hipertensos. A resposta contrátil frente a concentrações crescentes de angiotensina II, foi representada como % da contração ao KCl 75 mM. Podemos observar que a angiotensina II induziu resposta contrátil, de maneira concentração-dependente, nos anéis isolados de aorta de todos os grupos estudados.

Conforme demonstrado na Figura 22, no grupo Wistar, a resposta contrátil a angiotensina II foi menor durante a incubação com CID (angiotensina II $10^{-5,5}$ M; CT = $43,1 \pm 4,9$ vs CID $29,6 \pm 4,7\%$, $p < 0,05$), enquanto no grupo SHR, a inibição da PKD, não modificou a resposta contrátil a angiotensina II.

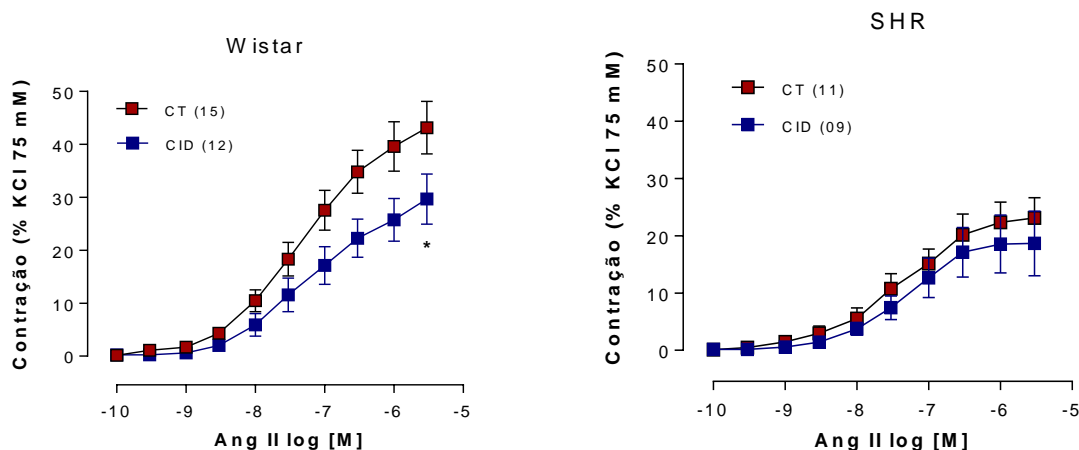


Figura 22. Participação da PKD sobre a reatividade vascular em anéis isolados de aorta. Curva concentração resposta à Angiotensina II na presença e ausência do inibidor da PKD (CID). Os dados são expressos como média \pm SEM. ANOVA one way, post hoc Tukey (* $p < 0,05$). Os números de anéis de aorta estão indicados entre parênteses

Na figura 23, estão representados os resultados da avaliação da participação do endotélio vascular, sobre a curva de contração a angiotensina II e a via da PKD, nos anéis isolados de aorta. No grupo Wistar, a retirada do endotélio vascular, não modificou a contração a angiotensina II. Entretanto, quando a via da PKD foi inibida, a retirada do endotélio vascular, induziu um aumento na resposta contrátil a angiotensina II (angiotensina II $10^{-5,5}$ M; CID = $29,6 \pm 4,7$ vs E- CID $84,4 \pm 14,4\%$, $p < 0,01$). Esses dados sugerem que a via da PKD, parece modular, a contração induzida pela angiotensina II, por uma via dependente da integridade do endotélio vascular, em animais normotensos. No grupo SHR, a retirada do endotélio vascular, aumentou a contração a angiotensina II, tanto na presença quanto na ausência da inibição da via da PKD (angiotensina II $10^{-5,5}$ M; E- CT = $137,0 \pm 13,0$ vs E- CID $89,9 \pm 3,3\%$, $p < 0,01$; (angiotensina II $10^{-5,5}$ M; CT = $23,1 \pm 3,5$ vs E- CT $137,0 \pm 13,0\%$, $p < 0,01$); (angiotensina II $10^{-5,5}$ M; CID = $18,6 \pm 5,6$ vs E- CID $89,9 \pm 3,3\%$, $p < 0,01$). Esses dados sugerem um papel modulatório da via da PKD, dependente do endotélio, sobre a contração induzida pela angiotensina II no grupo hipertenso.

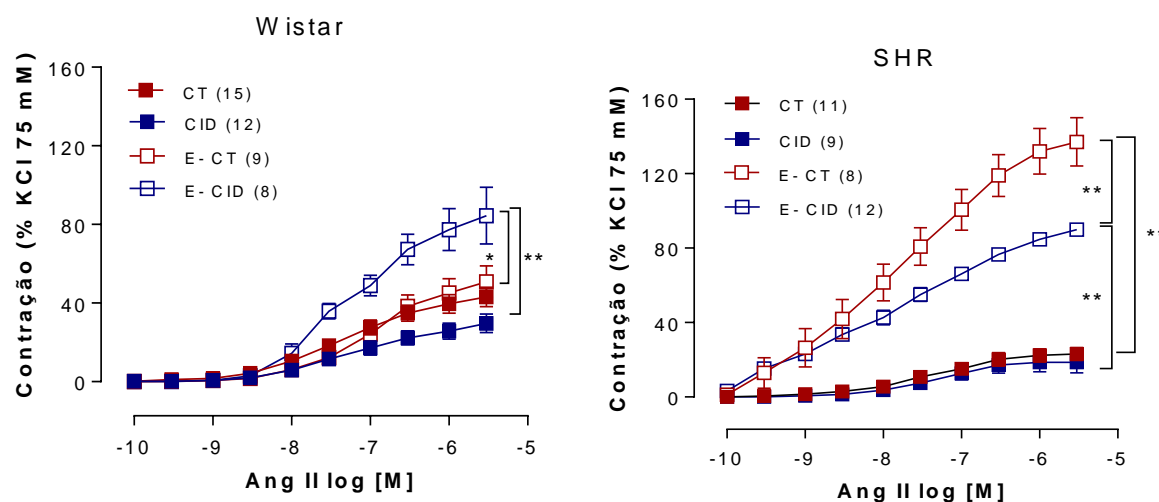


Figura 23. Participação da PKD sobre a reatividade vascular em anéis isolados de aorta, na presença e ausência do endotélio vascular (E-). Curva concentração resposta à Angiotensina II na presença e ausência do inibidor da PKD (CID). Os dados são expressos como média \pm SEM. ANOVA one way, post hoc Tukey (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$). Os números de anéis de aorta estão indicados entre parênteses.

A participação do NO na modulação da resposta contrátil à angiotensina II, foi realizada com incubação do L-NAME, um inibidor não seletivo da NOS, durante 30 minutos, conforme mostrado na figura 24. A incubação com L-NAME aumentou a resposta contrátil à angiotensina II em todos os grupos incubados conforme esperado. Podemos observar que tanto no grupo Wistar (angiotensina II $10^{-5,5}$ M; CT = $43,3 \pm 5,0$ vs LN $96,7 \pm 9,6\%$, $p < 0,01$; angiotensina II $10^{-5,5}$ M; CID = $30,8 \pm 5,4$ vs LN+CID $93,5 \pm 8,8\%$, $p < 0,01$) quanto no grupo SHR (angiotensina II $10^{-5,5}$ M; CT = $23,5 \pm 3,8$ vs LN $67,6 \pm 6,2\%$, $p < 0,01$; CID = $20,1 \pm 6,2$ vs LN+CID $72,2 \pm 8,6\%$, $p < 0,01$), a incubação com L-NAME aumentou as respostas contráteis induzida pela angiotensina II na presença de CID.

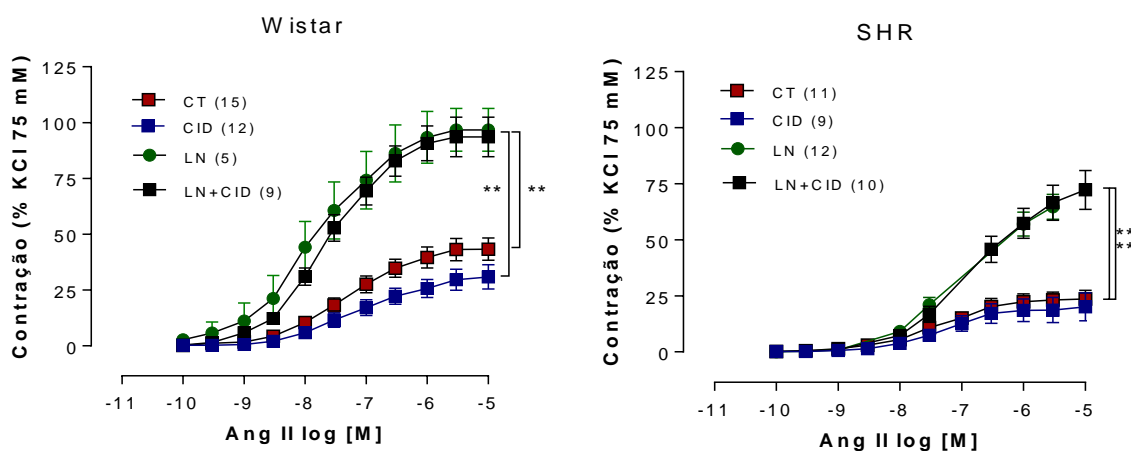


Figura 24. Participação da PKD sobre a reatividade vascular em anéis isolados de aorta, na presença e ausência da inibição da síntese de NO, pelo L-NAME (LN). Curva concentração resposta à Angiotensina II na presença e ausência do inibidor da PKD (CID). Os dados são expressos como média \pm SEM. ANOVA one way, post hoc Tukey (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$). Os números de anéis de aorta estão indicados entre parênteses.

Na figura 25, utilizamos um inibidor seletivo da nNOS para avaliarmos esta via sobre a modulação da resposta contrátil à angiotensina II em anéis condutância. Foi realizada incubação no banho com 100 μ M nNOS (grupo I nNOS), associado ou não ao CID. Esses grupos foram comparados entre eles e também com o grupo sem tratamento aqui chamado de CT. No grupo Wistar podemos verificar que a inibição da nNOS, não modificou a resposta contrátil da angiotensina II, na presença e na ausência de CID, no entanto, houve uma diminuição pontual na concentração mais elevada $10^{-5,5}$ M (CT = $43,1 \pm 4,9$ vs I nNOS $28,0 \pm 3,3\%$, $p < 0,01$), quando comparamos comparado ao grupo controle. Nos animais do grupo SHR, a inibição da nNOS elevou a resposta contrátil a angiotensina II (angiotensina II $10^{-5,5}$ M; CT = $23,1 \pm 3,5$ vs I nNOS $68,0 \pm 9,9\%$, $p < 0,05$; CID = $18,6 \pm 5,6$ vs I nNOS + CID $42,1 \pm 8,8\%$, $p < 0,05$). A inibição da via da PKD, reduziu o aumento da resposta contrátil a angiotensina II, durante a inibição da nNOS (I nNOS = $68,0 \pm 9,9$ vs I nNOS + CID $42,1 \pm 8,8\%$, $p < 0,01$). Estes dados sugerem que, no grupo hipertenso, a via de síntese de NO, dependente da enzima nNOS, participa da resposta contrátil induzida pela angiotensina II.

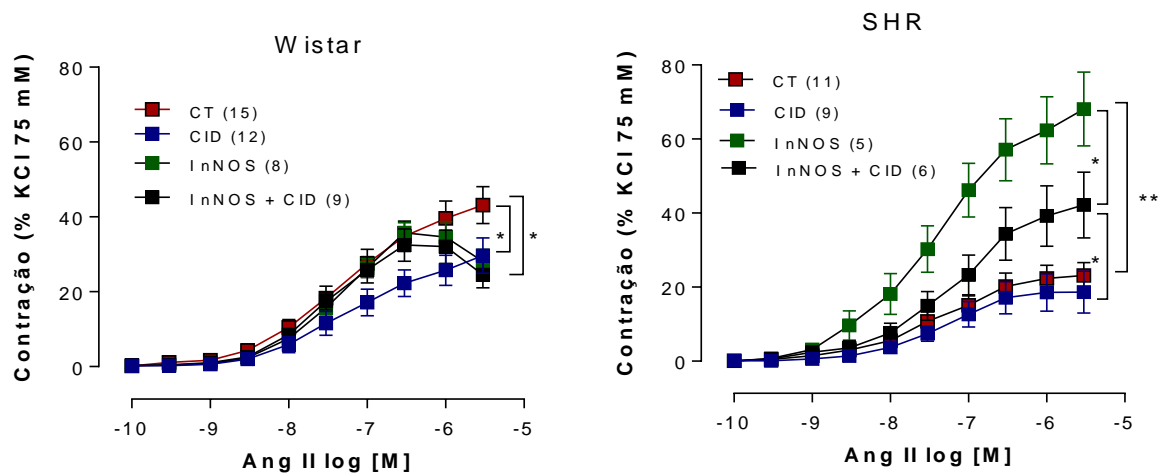


Figura 25. Participação da PKD sobre a reatividade vascular em anéis isolados de aorta, na presença e ausência da inibição da síntese de NO, pelo inibidor da nNOS (I nNOS). Curva concentração resposta à Angiotensina II na presença e ausência do inibidor da PKD (CID). Os dados são expressos como média \pm SEM. ANOVA one way, post hoc Tukey (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$). Os números de anéis de aorta estão indicados entre parênteses.

Na figura 26, estão representados os resultados de reatividade para avaliar a participação da produção de NO, via enzima iNOS, por meio do uso do composto 1400W, inibidor seletivo da iNOS. No grupo Wistar, a inibição da iNOS, aumentou a resposta contrátil a angiotensina II quando a enzima PKD foi inibida, com o CID (angiotensina II $10^{-5,5}$ M; CID = $29,6 \pm 4,7$ vs I iNOS+CID $57,4 \pm 10,7\%$, $p < 0,05$). No grupo SHR, podemos verificar que a contratilidade dependente de angiotensina II foi maior na presença do inibidor da iNOS, tanto na presença quanto na ausência da PKD (angiotensina II $10^{-5,5}$ M; CT = $23,1 \pm 3,5$ vs I iNOS $49,3 \pm 9,0\%$, $p < 0,01$; CID = $18,6 \pm 5,6$ vs I iNOS+CID $57,4 \pm 10,7\%$, $p < 0,01$). Estes dados sugerem que, no grupo SHR, a produção de NO, depende da enzima iNOS. A inibição da enzima PKD, não modificou esta resposta.

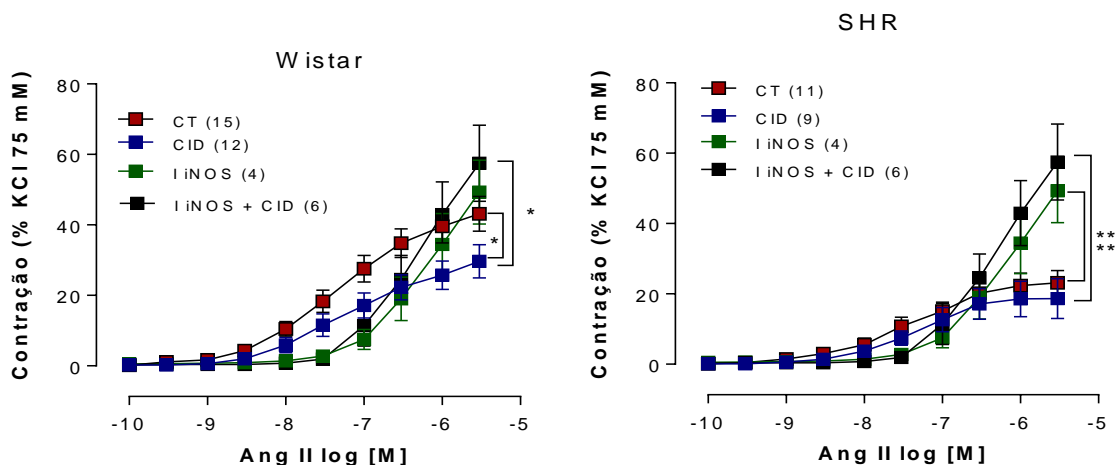


Figura 26. Participação da PKD sobre a reatividade vascular em anéis isolados de aorta, na presença e ausência da inibição da síntese de NO, pelo inibidor da iNOS (I iNOS). Curva concentração resposta à Angiotensina II na presença e ausência do inibidor da PKD (CID). Os dados são expressos como média \pm SEM. ANOVA one way, post hoc Tukey (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$). Os números de anéis de aorta estão indicados entre parênteses.

No gráfico 27, investigamos a participação do endotélio vascular sobre a participação da via da PKD e a modulação da via da iNOS, sobre a resposta contrátil da angiotensina II. No grupo Wistar, conforme esperado, a remoção do endotélio vascular, elevou a responsividade a angiotensina II quando comparada ao grupo com endotélio (angiotensina II $10^{-5,5}$ M; I iNOS = $49,3 \pm 9,0$ vs E- I iNOS $196,9 \pm 40,5\%$, $p < 0,01$; I Inos + CID = $57,4 \pm 10,7$ vs E- I Inos + CID $242,6 \pm 44,0\%$, $p < 0,01$), que não foi modificada pela inibição da PKD. No grupo SHR, a retirada do endotélio elevou a resposta contrátil a Angiotensina II (I iNOS = $21,3 \pm 6,6$ vs E- I iNOS $87,5 \pm 16\%$, $p < 0,05$; I Inos + CID = $40,4 \pm 7,7$ vs E- I Inos + CID $64,7 \pm 4,4\%$, $p < 0,05$), porém esta resposta não foi modificada pela PKD.

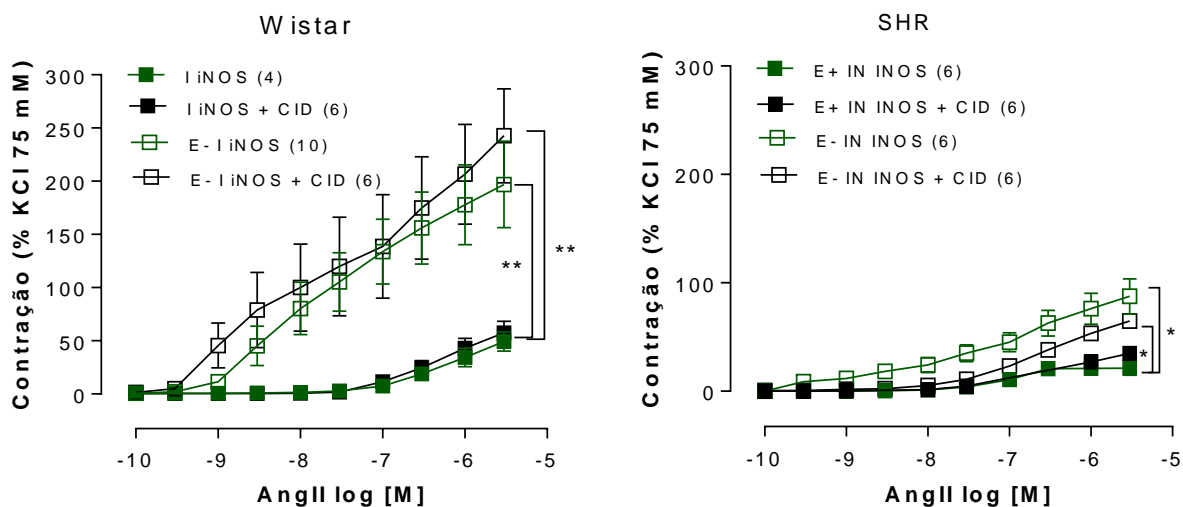


Figura 27. Participação da PKD sobre a reatividade vascular em anéis isolados de aorta, na presença e ausência da inibição da síntese de NO, pelo inibidor da iNOS (I iNOS), na presença e na ausência do endotélio vascular (E-). Curva concentração resposta à Angiotensina II na presença e ausência do inibidor da PKD (CID). Os dados são expressos como média \pm SEM. ANOVA one way, post hoc Tukey (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$). Os números de anéis de aorta estão indicados entre parênteses.

6 DISCUSSÃO

6.1 Papel da modulação da sinalização da PKD sobre a função de cardiomiócitos ventriculares

Neste estudo avaliamos as respostas da atividade da PKD em diferentes regiões do cardiomiócito (núcleo, citoplasma e mitocôndria) na tentativa de esclarecer novas vias e contribuir para futuras descobertas terapêuticas. Durante os experimentos utilizamos, angiotensina II (100 nM), aldosterona (100 nM) e isoproterenol (100 nM). Os resultados obtidos da análise do núcleo celular, demonstram que a mudança de transferência de energia por fluorescência (FRET) em relação ao tempo, foi maior com a utilização da aldosterona, quando comparado ao grupo controle e a angiotensina II. Estes resultados nos sugerem que, a aldosterona possui uma relação espaço temporal de ativação da PKD maior no núcleo do que no citosol. Bossuyt et al (2011), mostraram de maneira clara, que a ativação espaço temporal da PKD através da fenilefrina, apresentou maior e mais rápida FRET no núcleo, quando comparado com a endotelina 1, que por sua vez, apresentou maior ativação no sarcolema. Esses fármacos, possuem vias distintas que divergem na ativação espaço-temporal de PKD e CaMKII, entretanto, convergem na ativação da exportação nuclear de HDAC5 e regulação da transcrição.

No presente estudo, é possível sugerir que a aldosterona atua diretamente na PKD nuclear juntamente com as HDACs. As HDACs funcionam como importantes reguladores no remodelamento cardíaco através da associação com o fator de transcrição do fator potenciador do miócito-2 (MEF2)¹³⁰. Já no citosol do cardiomiócito e na mitocôndria, a transferência de energia por fluorescência em relação ao tempo (FRET), foi maior com a utilização da angiotensina II, quando comparado aos grupos tratados com aldosterona e salina. A angiotensina II, se liga a proteína G estimulatória (Gs), que acarreta ativação da adenilato ciclase e, posteriormente estimula a produção de DAG e IP₃, que se encontram ligados a proteína quinase C (PKC), e conseqüentemente, desencadeia alterações no ciclo Ca⁺² intracelular. No presente estudo demonstramos que essa via depende da ativação da PKD.

Entretanto, na mitocôndria cardíaca, a participação da angiotensina II, tem sido mais relacionada com o metabolismo celular. Pesquisadores identificaram uma via de ativação da PKD pelas EROs mitocondrial, que levou à indução de genes antioxidantes através da ativação do NF κ B¹³¹. Esses resultados são importantes, pois permitem esclarecer a via de atuação da angiotensina II e da aldosterona sobre a regulação funcional dos cardiomiócitos ventriculares, para que futuras terapias atuem de forma precisa e eficiente nesses locais.

6.2 Reatividade vascular estudada em anéis de aorta torácica de ratos

Wistar e SHR: papel da modulação da sinalização da PKD

Até o momento, o papel da via de sinalização da PKD como reguladora da reatividade vascular tem sido pouco estudado. Até onde conhecemos, este é o primeiro estudo funcional que avalia a participação da PKD sobre a reatividade vascular de animais normotensos e também hipertensos. No entanto, já foi demonstrado, em células isoladas, que a PKD pode ser ativada por vários estímulos, incluindo angiotensina II, agonista α -adrenérgicos, trombina e fatores de crescimento celular^{102-104,19}.

A hipótese do presente estudo foi que a enzima PKD participa da via de sinalização intracelular no sistema cardiovascular, modulando a ação de mediadores sobre a contração nos músculos liso e cardíaco. Para responder a estas perguntas, estudamos os efeitos da PKD sobre a estimulação de vias de contração do músculo cardíaco e sobre a reatividade vascular, em condições fisiológicas e também na hipertensão arterial.

A reatividade vascular foi estudada em vaso de condutância, anéis isolados da aorta torácica, de ratos Wistar e SHR jovens, evidenciando o papel modular do endotélio vascular sobre as respostas mediadas pela via da PKD.

Os principais achados desse estudo serão divididos nos resultados da avaliação da reatividade vascular sobre a ativação de receptor α -adrenérgico e sobre a ativação mediada pela angiotensina II:

6.3 Reatividade vascular durante ativação de receptor α -adrenérgico.

Para mimetizar a ativação do receptor α -adrenérgico vascular, os anéis isolados da aorta foram incubados com concentrações crescentes de fenilefrina. No grupo Wistar, a resposta contrátil a fenilefrina não foi modificada quando a PKD foi inibida com o CID tanto na presença quanto na ausência do endotélio vascular. Entretanto, quando a síntese de NO foi bloqueada, usando L-NAME, a resposta contrátil a fenilefrina, foi reduzida na presença de CID, sugerindo um possível papel modulador da PKD sobre a contração. Nossa hipótese, é que a via da PKD poderia estar estimulando uma via vasoconstrictora, ou mesmo, inibindo uma via de relaxamento, que seria equilibrada pela produção de NO endotelial ou muscular.

Nossa interpretação desses primeiros resultados para o grupo Wistar é que, na ausência do NO (presença de L-NAME), a inibição da PKD teria deixado de ativar a uma via constrictora, o que explicaria a redução ainda maior da contração a fenilefrina. Por outro lado, seria possível também que a ativação de receptores α -adrenérgicos, a via da PKD, inibiria um fator de relaxamento, que não o NO, contribuindo para diminuir a contração a fenilefrina. De fato, já é comprovado que a ativação de receptores α vasculares, é capaz de induzir contração, por uma via dependente de aumento de IP3 e DAG, o qual é capaz de ativar a PKD. O IP3 atua interagindo com seus receptores na membrana do retículo sarcoplasmático estimulando a liberação de Ca^{2+} intracelular. O DAG atua ativando a PKC, que por sua vez, aumenta a concentração de Ca^{2+} , a sensibilidade das proteínas contráteis ao Ca^{2+} e fosforilação da cadeia leve da miosina (MLC), culminando em contração do músculo liso vascular. Nossos resultados mostram que, essa via de modulação da contração PKD-dependente, parece ser contrabalanceada pela produção de NO, o que mantém o equilíbrio no mecanismo de contração vascular via ativação de receptores α adrenérgicos. Para verificar se a produção de NO seria decorrente da ativação de uma ou mais isoformas da NOS, fizemos os bloqueios específicos das enzimas nNOS e iNOS, na presença e ausência da PKD e do endotélio vascular.

Nossos resultados funcionais mostraram que, muito embora, a inibição da nNOS tenha sido capaz de aumentar a resposta contrátil a fenilefrina, a inibição da PKD, não modificou essa resposta, sugerindo que essa não seria uma via importante como fonte de ativação para a produção de NO, modulada pela PKD. Para confirmar essa hipótese, teremos que medir a expressão proteica, a atividade dessa enzima e a produção de NO durante o bloqueio da PKD, na presença e ausência do inibidor da iNOS.

Em seguida, avaliamos a participação da iNOS nessa resposta. A inibição seletiva e específica da iNOS, aumentou a vasoconstricção apenas nas doses mais altas de fenilefrina (entre 10^{-4} e $10^{-3,5}$ M). Entretanto, a inibição da PKD, impediu esse aumento. Estes resultados sugerem que a via de produção de NO, ativada pela enzima iNOS, não parece influenciar a modulação contrátil em concentrações menores de fenilefrina, porém, concentrações mais altas parecem sim depender da via da PKD. A próxima pergunta visou entender o papel da iNOS endotelial sobre a participação na via da PKD na resposta contrátil à fenilefrina nos anéis de aorta torácica. No grupo Wistar, como esperado, a retirada do endotélio vascular, aumentou a contração a fenilefrina. Entretanto, na ausência do endotélio vascular, não houve diferença na contração induzida pela fenilefrina, quando a PKD foi inibida. Estes dados sugerem uma modulação da PKD, via enzima iNOS endotelial.

No grupo SHR, a via da PKD, modulou a resposta à fenilefrina, na presença e na ausência do endotélio vascular. Diferente do que ocorreu com o grupo Wistar, onde a inibição da via da PKD, não modificou a resposta a fenilefrina, mesmo após a retirada do endotélio vascular. A incubação dos anéis de aorta com L-NAME + CID, promoveu aumento da resposta constritora, quando comparada com a incubação CID. No entanto, quando comparado os grupos CT Vs LN, essa resposta não apresentou diferença. Estes resultados sugerem que, no grupo SHR, a redução na contração a fenilefrina, induzida pela inibição da PKD, é dependente da via da NOS.

No grupo SHR, a contração a fenilefrina não foi modificada pela inibição dupla da nNOS e da via da PKD. Este resultado sugere, a participação da via da nNOS, sobre a resposta mediada pela PKD. Já no grupo SHR, a queda da

contração a fenilefrina induzida pela inibição da PKD, depende da via da nNOS. Considerando que a inibição da nNOS promoveu o mesmo resultado na via da PKD, nos vasos com e sem endotélio, podemos sugerir, que a origem da nNOS possa ser proveniente tanto do endotélio quanto do músculo liso vascular. Entretanto, para confirmar essa hipótese, teremos que medir a expressão proteica, a atividade dessa enzima e a produção de NO durante o bloqueio da PKD, na presença e ausência do inibidor da nNOS em estudos futuros.

A inibição da iNOS, não modificou a contração a fenilefrina nos grupos controle e CID. Estes resultados sugerem que a via de produção de NO, ativada pela enzima iNOS, não parece influenciar a modulação contrátil, via PKD, durante a contração induzida pela fenilefrina no grupo SHR.

Quando analisamos a participação da iNOS nesta resposta, vimos que, a remoção do endotélio vascular no grupo SHR, aumentou a resposta contrátil a fenilefrina, na presença e ausência de CID, inibidor da PKD. Do mesmo modo, a inibição da PKD, foi capaz de diminuir a resposta máxima de contração a fenilefrina. Estes dados sugerem que participação modulatória da PKD, sobre a contração a fenilefrina, ocorre mesmo na ausência do endotélio vascular e da inibição da enzima iNOS.

Animais SHR podem preservar e até mesmo reduzir a reatividade vascular, tanto na presença quanto na ausência do endotélio vascular^{105,106}. Entretanto, a disfunção endotelial é uma característica importante da hipertensão arterial, inclusive no modelo SHR.

Os estudos demonstram que a disfunção endotelial em SHR, é causada pela inativação oxidativa do NO¹⁰⁷. Outro fator agravante é a maior produção de ânions superóxido vascular dos animais do grupo SHR. Zalba e col (2001)¹⁰⁸ demonstraram um aumento na atividade da NADH/NADPH oxidase na aorta de SHR e redução do relaxamento dependente do NO. Entretanto, Grunfeld e col (1995)¹⁰⁹ demonstraram que em vasos de SHR, a produção de NO não é afetada e pode até mesmo estar aumentada. Neste caso, o NO não é capaz de estimular quantidades suficientes de cGMP e manter uma vasodilatação dependente de NO. Muito embora já existam muitos estudos

nesta área, os mecanismos envolvidos na fisiopatologia da hipertensão do SHR ainda não estão totalmente esclarecidos. Alguns estudos têm descrito que a angiotensina II tem um importante papel na hipertensão nestes ratos, o que explica o fato de que, durante o uso de inibidores de ECA, ocorre redução da pressão arterial, o que é traduzida em uma redução dos índices de mortalidade^{110,111}.

No presente estudo, nós avaliamos a participação das diferentes isoformas da NOS (iNOS, eNOS e nNOS), usando bloqueadores dessas enzimas. Para avaliar a participação da iNOS, os anéis de aorta foram pré-incubados com o inibidor específico e seletivo, composto 1400W. A inibição seletiva da nNOS foi realizada no nosso estudo, usando o inibidor altamente específico e seletivo (N5-[Imino(propylamino)methyl]-L-ornithine hydrochloride, (K_i = 57 nM). Este inibidor apresenta seletividade 3158 vezes e 149-vezes maior sobre a nNOS do que sobre a iNOS and eNOS, respectivamente).

Os estudos em vasos têm descrito aumento na expressão da eNOS e da iNOS nos SHR em relação aos ratos Wistar¹¹²⁻¹¹⁴. O que tem sido mostrado é que, muito embora a eNOS esteja aumentada nos vasos, aparentemente ela não está acoplada e ativa, uma vez que ao tratar SHR com BH4, um co-fator da NOS, observa-se uma maior resposta mediada pelo NO, com redução na pressão arterial¹¹⁵. Além do mais, tem sido descrito que a atividade normal da eNOS na aorta de ratos SHR e seu grupo controle, mesmo que a expressão proteica dessa enzima esteja aumentada na aorta de animais SHR comparado ao grupo controle^{116,117,113}.

Um aspecto importante a se analisar, é que, a hipertensão arterial tem sido associada a um número menor de cavéolas no endotélio vascular. Potje et al., (2019)¹¹⁸ demonstraram que a disfunção das cavéolas no endotélio vascular, promove o desacoplamento de eNOS em vasos de ratos normotensos e hipertensos. As cavéolas são invaginações da membrana plasmática, enriquecidas com colesterol e esfingolipídios, contendo proteínas caveolina (Cav-1) em sua estrutura, onde ocorre a síntese de NO devido à alta concentração de eNOS.

Sanchez-Ruiloba et al, (2014)¹¹⁹ demonstraram que a PKD1 interage com o nNOS e fosforila a Ser1412 melhorando desta maneira a atividade nNOS e a produção de NO. Este foi um importante indicador do papel crucial

da PKD1 na regulação da ativação da nNOS e síntese de NO, um mediador envolvido na sinalização fisiológica.

Assim, os resultados apresentados neste estudo, corroboram o fato de que animais SHR apresentem disfunção endotelial e que a PKD participa deste processo. Nossos resultados indicam que os animais SHR possuem um efeito reduzido do fator de relaxamento derivado do endotélio vascular, o que pode ser devido a uma menor liberação de NO ou maior liberação de fator de contração liberado pelo endotélio.

As PKDs são expressas em várias células e tecidos e participam de vias de sinalização intracelular para regular processos, incluindo a sobrevivência celular, proliferação, motilidade celular, transporte através de membranas e resposta imune^{120,121,15}. As PKDs 1 e 2 são expressas em células endoteliais e evidências recentes indicam que a ativação da PKD é necessária para respostas biológicas ao fator de crescimento endotelial vascular (VEGF ou VEGF-A) em células endoteliais importantes para angiogênese^{121,15}. Pouco se sabe sobre o papel da PKD3 na sinalização de células endoteliais, mas até o momento os trabalhos tem sugerido que ela seja expressa em níveis baixos nessas células e não desempenhe nenhum papel significativo na migração endotelial¹²⁰.

Aicart-Ramos et al., 2014¹²², demonstraram que a PKD fosforila a eNOS, levando à sua ativação e a um aumento concomitante da síntese de NO endotelial. Já em 1993, Brock e colaboradores relataram que a vasodilatação induzida pelo Fator de Crescimento do Endotélio Vascular (VEGF), nas células endoteliais, era dependente da atividade eNOS, uma vez que a pré-incubação com inibidores da eNOS, como o L-NMMA, bloqueava o relaxamento das artérias coronárias induzidas por VEGF. Como o VEGF ativa as isoformas da PKD nas células endoteliais, nós realizamos os experimentos para verificar se a PKD poderia usar a eNOS como substrato direto no endotélio gerando NO. O NO gerado pela eNOS estimula a síntese de guanosina monofosfato cíclico (cGMP) pela guanilato ciclase solúvel que, por sua vez, leva ao relaxamento do músculo liso vascular¹²³.

6.4 Reatividade Vascular a Angiotensina II.

Neste estudo, avaliamos a modulação vascular da contração a angiotensina II, via PKD. Já é bem conhecida a ação da angiotensina II sobre a função vascular como: induzindo a expressão de COX-2^{124,125}, aumentando a produção de espécies reativas do oxigênio (Wolf, 2000)¹²⁶, reduzindo a biodisponibilidade do NO e conseqüentemente disfunção endotelial¹²⁷.

Os resultados deste trabalho demonstraram que a angiotensina II induziu uma resposta contrátil, de maneira concentração-dependente, nos anéis isolados de aorta nos animais normotensos e hipertensos. No grupo Wistar, a resposta contrátil a angiotensina II foi menor durante a incubação com CID, enquanto no grupo SHR, a inibição da PKD, não modificou a resposta contrátil a angiotensina II. Em seguida, avaliamos a participação do endotélio vascular nesta resposta. No grupo Wistar, a retirada do endotélio vascular, não modificou a contração a angiotensina II. Esta resposta poderia ser explicada pelas ações consideradas antagônicas da angiotensina II sobre o músculo liso vascular. A angiotensina II pode agir se ligando a diferentes receptores de membrana.

Entre os importantes receptores vasculares, estão os receptores tipo 1 (AT1) que também são amplamente distribuídos por todos os órgãos e os receptores para angiotensina tipo 2 (AT2). A ação da angiotensina II sobre os receptores AT1 pode ser descrita sucintamente por causar vasoconstrição e aumentar da proliferação e o crescimento celular. Os receptores AT2 antagonizam os efeitos dos receptores AT1, promovendo relaxamento do músculo liso vascular.

Entretanto, quando a via da PKD foi inibida, a retirada do endotélio vascular, induziu um aumento na resposta contrátil a angiotensina II. Esses dados sugerem que a via da PKD, parece modular, a contração induzida pela angiotensina II, por uma via dependente da integridade do endotélio vascular, em animais normotensos. No entanto, no grupo SHR, a retirada do endotélio vascular, aumentou a contração à angiotensina II, tanto na presença quanto na ausência da inibição da via da PKD.

Nossos resultados sugerem um papel modulatório da via da PKD, dependente do endotélio, sobre a contração induzida pela angiotensina II no grupo hipertenso.

Considerando que a angiotensina II também pode modular a via da NOS, tanto endotelial quanto muscular, neste trabalho, nós inibimos a via da NOS com L-NAME e também com os inibidores seletivos da iNOS e nNOS. A incubação dos anéis de aorta com L-NAME aumentou a resposta contrátil à angiotensina II em todos os grupos incubados. Podemos observar que tanto no grupo Wistar quanto no grupo SHR, que a incubação com CID não modificou a resposta contrátil induzida pela angiotensina II na presença de L-NAME.

No grupo Wistar podemos verificar que a inibição da nNOS, não modificou a resposta contrátil da angiotensina II, na presença e na ausência de CID, no entanto, houve uma diminuição pontual na concentração mais elevada $10^{-5.5}$ M, quando comparado ao grupo controle. Nos animais do grupo SHR, a inibição da nNOS elevou a resposta contrátil a angiotensina II. A inibição da via da PKD, reduziu o aumento da resposta contrátil a angiotensina II, durante a inibição da nNOS. Estes dados sugerem que, no grupo hipertenso, a via de síntese de NO, dependente da enzima nNOS, participa da resposta contrátil induzida pela angiotensina II.

No grupo Wistar, a inibição da iNOS, aumentou a resposta contrátil a angiotensina II quando a enzima PKD foi inibida, com o CID. No grupo SHR, podemos verificar que a contratilidade dependente de angiotensina II foi maior na presença do inibidor da iNOS, tanto na presença quanto na ausência da PKD. Estes dados sugerem que, no grupo SHR, a produção de NO, depende da enzima iNOS. A inibição da enzima PKD, não modificou esta resposta. investigamos a participação do endotélio vascular sobre a participação da via da PKD e a modulação da via da iNOS, sobre a resposta contrátil da angiotensina II. No grupo Wistar, conforme esperado, a remoção do endotélio vascular, elevou a responsividade a angiotensina II quando comparada ao grupo com endotélio, que não foi modificada pela inibição da PKD. No grupo SHR, a retirada do endotélio elevou a resposta contrátil a angiotensina II, porem esta resposta não foi modificada pela PKD.

O mecanismo de ação da angiotensina II via AT₂, difere no mecanismo induzido via receptor AT₁, onde a cascata de sinalização desencadeada via o AT₂ é capaz de ativar a *Protein serine/threonine Phosphatase 2A* (PP2A), que direciona o sinal para o controle da atividade de canais para K⁺ e Ca²⁺ ⁶⁶. Por esta via, ocorre regulação negativa da ativação da cascata *Mitogen Activated Protein Kinase* (MAP Cinase) desencadeada pela ativação do AT₁ ⁶⁷ e da fosfolipase citosólica A2 (cPLA2) ¹²⁸. Os receptores AT₂ são encontrados em maior quantidade na aorta e coronária. Seus efeitos fisiológicos são antagônicos aos do AT₁ e incluem diversas ações, como vasodilatação através da liberação de óxido nítrico e bradicinina.

A ação da angiotensina II sobre o receptor AT₁ ocorre por vias mediadas por proteínas G, a qual por sua vez estimula a fosfolipase C, induzindo a formação de trifosfato de inositol (IP₃) e diacilglicerol (DAG), liberando Ca²⁺ citoplasmático ativando proteína quinase-C (PKC), a adenil-ciclase e a PKD. O mecanismo de ação da Ang II via receptor 1 de angiotensina (AT₁R), ocorre através de sua ligação com AT₁R associado à proteína G, a qual por sua vez estimula a fosfolipase C beta, induzindo trifosfato de inositol e diacilglicerol (DAG), liberando Ca²⁺ citoplasmático ativando proteína quinase-C (PKC) e adenil-ciclase. A Ang II também estimula a musculatura vascular lisa através vias de sinalização, como a fosfolipase C, fosfolipase A2 e fosfolipase D ¹²⁹.

Os dados do presente estudo, podem ser corroborados pelos estudos em cultura de células de músculo liso vascular. Abedi et al., (1998) ¹⁰², relataram que Angiotensina II estimula a ativação de PKD em célula muscular lisa de coelho. Tan et al. (2004) ¹⁰³ mostraram, usando cultura de célula muscular de aorta de rato, que a Angiotensina II induz a ativação da PKD via receptor AT₁.

No presente estudo, demonstramos que no grupo Wistar, a resposta contrátil a angiotensina II foi menor durante a incubação com CID, diferente do que ocorreu no grupo SHR, onde a inibição da PKD, não modificou a resposta contrátil a angiotensina II. A retirada do endotélio vascular, aumentou a contração a Angiotensina II, tanto na presença quanto na ausência da inibição da via da PKD. Esses dados sugerem um papel modulatório da via da PKD, dependente do endotélio, sobre a contração induzida pela Angiotensina II no grupo hipertenso. Tanto no grupo Wistar quanto no grupo SHR, a incubação

com CID não modificou a resposta contrátil induzida pela angiotensina II na presença de L-NAME, sugerindo que a PKD influencia a via endotelial de produção de NO, via NOS.

Para verificar qual das isoenzimas da NOS estaria envolvida nesta resposta, os anéis de aorta foram co-encubados com inibidores específicos e seletivos da iNOS e nNOS. A inibição da nNOS elevou a resposta contrátil a angiotensina II. A inibição da via da PKD, reduziu o aumento da resposta contrátil a Angiotensina II, durante a inibição da nNOS. Estes dados sugerem que, no grupo hipertenso, a via de síntese de NO, dependente da enzima nNOS, participa da resposta contrátil induzida pela angiotensina II. Por outro lado, a contração dependente de angiotensina II foi maior na presença do inibidor da iNOS, tanto na presença quanto na ausência da PKD. Estes dados sugerem que, no grupo SHR, a produção de NO, depende da enzima iNOS. A inibição da enzima PKD, não modificou esta resposta. A retirada do endotélio elevou a resposta contrátil a Angiotensina II, porém esta resposta não foi modificada pela PKD.

6.5 Resumo dos principais achados do estudo da reatividade vascular

6.5.1 Resposta via Receptor alfa

Grupo Wistar

Analisando os resultados deste trabalho, podemos sugerir que a via de sinalização da PKD estaria estimulando uma via vasoconstrictora, ou mesmo, inibindo uma via de relaxamento, que seria equilibrada pela produção de NO endotelial ou muscular. Nossos resultados sugerem que, a via de modulação da contração vascular, ativada por receptores α -adrenérgicos, é dependente da via PKD, que parece ser contrabalanceada pela produção de NO, mantendo um estado de equilíbrio entre os mecanismos de contração e relaxamento vascular. A produção de NO parece ser dependente principalmente da ativação da eNOS e da via da iNOS.

Grupo SHR

Nossa hipótese é que a via da PKD estimula uma via vasoconstrictora, ou mesmo, inibe uma via de relaxamento, o que explicaria, pelo menos em parte, o aumento da resposta vasoconstrictora a fenilefrina no grupo SHR. A inibição da iNOS, não modificou a contração a fenilefrina nos grupos controle e CID. Estes resultados sugerem que a via de produção de NO, ativada pela enzima iNOS, não parece influenciar a modulação contrátil, via PKD, durante a contração induzida pela fenilefrina. Por outro lado, a inibição da nNOS não modificou a resposta contrátil a fenilefrina. Entretanto, quando a via da PKD foi inibida, com CID, a resposta contrátil a fenilefrina foi amplificada, tornando-se semelhante a resposta observada no grupo controle. Estes resultados sugerem que, no grupo SHR, a queda da contração a fenilefrina induzida pela inibição da PKD, depende principalmente da via da nNOS e da eNOS.

Nos dois grupos estudados, Wistar e SHR, a PKD parece ativar mediadores vasoconstrictores e também vasodilatadores, dependente da via da NOS, frente a ativação de receptor α -adrenérgico. No grupo Wistar as isoformas mais influenciadas pela PKD parecem ser a eNOS e iNOS e no grupo SHR a nNOS e eNOS. Entretanto, a confirmação dessa hipótese depende de realização de análise das expressões proteínas e atividade dessas enzimas, complementada com análise de produção "in situ" de NO.

6.5.2 Resposta mediada pela angiotensina II:

Os resultados obtidos no presente estudo, sugerem que, no grupo Wistar, a angiotensina II ativa a via da PKD endotelial, que por sua vez, inibe a produção de NO. Quando a angiotensina II se liga aos seus receptores no músculo liso vascular, ela ativa a via da PKD, a qual estimula a liberação de NO, contrabalanceando o efeito vasoconstrictor. No grupo hipertenso, a PKD parece inibir principalmente a nNOS muscular.

7.CONCLUSÃO

Em conclusão, o conjunto dos resultados obtidos neste estudo, confirmam nossa hipótese da participação da via de sinalização da PKD sobre a regulação aguda das funções de cardiomiócitos ventriculares e sobre a reatividade vascular. Em cardiomiócitos ventriculares, a aldosterona ativou diretamente a PKD nuclear juntamente com as HDACs, importantes reguladores no remodelamento cardíaco. Já no citosol e nas mitocôndrias, a angiotensina II ativou a via da PKD1.

Nos animais hipertensos, este papel modulador da sinalização da via da PKD sobre as respostas vasculares mediadas pela angiotensina II e fenilefrina, depende da ativação de distintas isoformas da NOS, localizadas no músculo liso vascular e endotélio. No grupo hipertenso, a modulação, via PKD, parece depender mais da participação da nNOS, enquanto no grupo normotenso, das vias da eNOS e iNOS.

8. REFERÊNCIAS

1. Benjamin EJ, Virani SS, Callaway CW, Chamberlain AM, Chang AR, Cheng S, Chiuve SE, Cushman M, Delling FN, Deo R, de Ferranti SD, Ferguson JF, Fornage M, Gillespie C, Isasi CR, Jiménez MC, Jordan LC, Judd SE, Lackland D, Lichtman JH, Lisabeth L, Liu S, Longenecker CT, Lutsey PL, Mackey JS, Matchar DB, Matsushita K, Mussolino ME, Nasir K, O'Flaherty M, Palaniappan LP, Pandey A, Pandey DK, Reeves MJ, Ritchey MD, Rodriguez CJ, Roth GA, Rosamond WD, Sampson UKA, Satou GM, Shah SH, Spartano NL, Tirschwell DL, Tsao CW, Voeks JH, Willey JZ, Wilkins JT, Wu JH, Alger HM, Wong SS and Muntner P. Heart Disease and Stroke Statistics—2018 Update: A Report From the American Heart Association. *Circulation*. 2018;137:e67-e492.
2. Callan PD and Clark AL. Heart failure – what's new and what's changed? *Clinical Medicine*. 2017;17:341-346.
3. Anand I. Stable but Progressive Nature of Heart Failure: Considerations for Primary Care Physicians. *American journal of cardiovascular drugs : drugs, devices, and other interventions*. *Am J Cardiovasc Drugs*. 2018 ;18(5):333-345.
4. Ambrosy AP, Mentz RJ, Fiuzat M, Cleland JGF, Greene SJ, O'Connor CM, Teerlink JR, Zannad F and Solomon SD. The role of angiotensin receptor-neprilysin inhibitors in cardiovascular disease-existing evidence, knowledge gaps, and future directions. *European journal of heart failure*. 2018;20:963-972.
5. Evandro Tinoco Mesquita, Antonio José Lagoeiro Jorge, Luciana Moraes Rabelo, Celso Vale Souza Jr. Entendendo a Hospitalização em Pacientes com Insuficiência Cardíaca. *International Journal of Cardiovascular Sciences*. 2017;30(1):81-90
6. Azevedo PS, Polegato BF, Minicucci MF, Paiva SAR and Zornoff LAM. Cardiac Remodeling: Concepts, Clinical Impact, Pathophysiological. *Arquivos Brasileiros de Cardiologia*. 2016;106:62-9.
7. Opie LH, Commerford PJ, Gersh BJ and Pfeffer MA. Controversies in ventricular remodelling. *Lancet (London, England)*. 2006;367:356-67.

8. Wood BM and Bossuyt J. Emergency Spatiotemporal Shift: The Response of Protein Kinase D to Stress Signals in the Cardiovascular System. *Frontiers in pharmacology*. 2017;8:9.
9. Avkiran M, Rowland AJ, Cuello F and Haworth RS. Protein kinase d in the cardiovascular system: emerging roles in health and disease. *Circulation research*. 2008;102:157-63.
10. McKinsey TA and Olson EN. Toward transcriptional therapies for the failing heart: chemical screens to modulate genes. *The Journal of clinical investigation*. 2005;115:538-46.
11. Venardos K, De Jong KA, Elkamie M, Connor T and McGee SL. The PKD inhibitor CID755673 enhances cardiac function in diabetic db/db mice. *PloS one*. 2015;10:e0120934.
12. Tandon M, Wang L, Xu Q, Xie X, Wipf P and Wang QJ. A targeted library screen reveals a new inhibitor scaffold for protein kinase D. *PloS one*. 2012;7:e44653.
13. Meredith EL, Beattie K, Burgis R, Capparelli M, Chapo J, Dipietro L, Gamber G, Enyedy I, Hood DB, Hosagrahara V, Jewell C, Koch KA, Lee W, Lemon DD, McKinsey TA, Miranda K, Pagratis N, Phan D, Plato C, Rao C, Rozhitskaya O, Soldermann N, Springer C, van Eis M, Vega RB, Yan W, Zhu Q and Monovich LG. Identification of potent and selective amidopyridyl inhibitors of protein kinase D. *Journal of medicinal chemistry*. 2010;53:5422-38.
14. Meredith EL, Ardayfio O, Beattie K, Dobler MR, Enyedy I, Gaul C, Hosagrahara V, Jewell C, Koch K, Lee W, Lehmann H, McKinsey TA, Miranda K, Pagratis N, Pancost M, Patnaik A, Phan D, Plato C, Qian M, Rajaraman V, Rao C, Rozhitskaya O, Ruppen T, Shi J, Siska SJ, Springer C, van Eis M, Vega RB, von Matt A, Yang L, Yoon T, Zhang JH, Zhu N and Monovich LG. Identification of orally available naphthyridine protein kinase D inhibitors. *Journal of medicinal chemistry*. 2010;53:5400-21.
15. Evans IM, Bagherzadeh A, Charles M, Raynham T, Ireson C, Boakes A, Kelland L and Zachary IC. Characterization of the biological effects of a novel

protein kinase D inhibitor in endothelial cells. *The Biochemical journal*. 2010;429:565-72.

16. Liu X, Xu Q, Wang X, Zhao Z, Zhang L, Zhong L, Li L, Kang W, Zhang Y and Ge Z. Irbesartan ameliorates diabetic cardiomyopathy by regulating protein kinase D and ER stress activation in a type 2 diabetes rat model. *Pharmacological research*. 2015;93:43-51.

17. Harrison BC, Kim MS, van Rooij E, Plato CF, Papst PJ, Vega RB, McAnally JA, Richardson JA, Bassel-Duby R, Olson EN and McKinsey TA. Regulation of cardiac stress signaling by protein kinase d1. *Molecular and cellular biology*. 2006;26:3875-88.

18. Bossuyt J, Helmstadter K, Wu X, Clements-Jewery H, Haworth RS, Avkiran M, Martin JL, Pogwizd SM and Bers DM. Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II delta and protein kinase D overexpression reinforce the histone deacetylase 5 redistribution in heart failure. *Circulation research*. 2008;102:695-702.

19. Fielitz J, Kim MS, Shelton JM, Qi X, Hill JA, Richardson JA, Bassel-Duby R and Olson EN. Requirement of protein kinase D1 for pathological cardiac remodeling. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2008;105:3059-63.

20. Haworth RS, Goss MW, Rozengurt E and Avkiran M. Expression and activity of protein kinase D/protein kinase C mu in myocardium: evidence for alpha1-adrenergic receptor- and protein kinase C-mediated regulation. *Journal of molecular and cellular cardiology*. 2000;32:1013-23.

21. Oster H, Abraham D and Leitges M. Expression of the protein kinase D (PKD) family during mouse embryogenesis. *Gene expression patterns : GEP*. 2006;6:400-8.

22. Wang P, Han L, Shen H, Wang P, Lv C, Zhao G, Niu J, Xue L, Wang QJ, Tong T and Chen J. Protein kinase D1 is essential for Ras-induced senescence and tumor suppression by regulating senescence-associated inflammation.

Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 2014;111:7683-8.

23. Rozengurt E, Sinnott-Smith J, Van Lint J and Valverde AM. Protein kinase D (PKD): a novel target for diacylglycerol and phorbol esters. *Mutation research*. 1995;333:153-60.

24. Rozengurt E. Protein kinase D signaling: multiple biological functions in health and disease. *Physiology*. 2011;26:23-33.

25. Steinberg SF. Regulation of protein kinase D1 activity. *Molecular pharmacology*. 2012;81:284-91.

26. Waldron RT, Rey O, Iglesias T, Tugal T, Cantrell D and Rozengurt E. Activation loop Ser744 and Ser748 in protein kinase D are transphosphorylated in vivo. *The Journal of biological chemistry*. 2001;276:32606-15.

27. Waldron RT, Innamorati G, Torres-Marquez ME, Sinnott-Smith J and Rozengurt E. Differential PKC-dependent and -independent PKD activation by G protein alpha subunits of the Gq family: selective stimulation of PKD Ser(7)(4)(8) autophosphorylation by Galphaq. *Cellular signalling*. 2012;24:914-21.

28. Guo J, Gertsberg Z, Ozgen N, Sabri A and Steinberg SF. Protein kinase D isoforms are activated in an agonist-specific manner in cardiomyocytes. *The Journal of biological chemistry*. 2011;286:6500-9.

29. Storz P. Mitochondrial ROS--radical detoxification, mediated by protein kinase D. *Trends in cell biology*. 2007;17:13-8.

30. Storz P, Doppler H and Toker A. Protein kinase D mediates mitochondrion-to-nucleus signaling and detoxification from mitochondrial reactive oxygen species. *Molecular and cellular biology*. 2005;25:8520-30.

31. Cowell CF, Doppler H, Yan IK, Hausser A, Umezawa Y and Storz P. Mitochondrial diacylglycerol initiates protein-kinase D1-mediated ROS signaling. *Journal of cell science*. 2009;122:919-28.

32. Ozgen N, Guo J, Gertsberg Z, Danilo P, Jr., Rosen MR and Steinberg SF. Reactive oxygen species decrease cAMP response element binding protein expression in cardiomyocytes via a protein kinase D1-dependent mechanism that does not require Ser133 phosphorylation. *Molecular pharmacology*. 2009;76:896-902.
33. Xiang SY, Vanhoutte D, Del Re DP, Purcell NH, Ling H, Banerjee I, Bossuyt J, Lang RA, Zheng Y, Matkovich SJ, Miyamoto S, Molckentin JD, Dorn GW, 2nd and Brown JH. RhoA protects the mouse heart against ischemia/reperfusion injury. *The Journal of clinical investigation*. 2011;121:3269-76.
34. Xiang SY, Ouyang K, Yung BS, Miyamoto S, Smrcka AV, Chen J and Heller Brown J. PLCepsilon, PKD1, and SSH1L transduce RhoA signaling to protect mitochondria from oxidative stress in the heart. *Science signaling*. 2013;6:ra108.
35. Jhun BS, J OU, Adaniya SM, Mancini TJ, Cao JL, King ME, Landi AK, Ma H, Shin M, Yang D, Xu X, Yoon Y, Choudhary G, Clements RT, Mende U and Sheu SS. Protein kinase D activation induces mitochondrial fragmentation and dysfunction in cardiomyocytes. *The Journal of physiology*. 2018;596:827-855.
36. Erickson JR, Joiner MA, Guan X, Kutschke W, Yang J, Oddis CV, Bartlett RK, Lowe JS, O'Donnell S, Aykin-Burns N, Zimmerman MC, Zimmerman K, Ham AJL, Weiss RM, Spitz DR, Shea MA, Colbran RJ, Mohler PJ and Anderson ME. A dynamic pathway for calcium-independent activation of CaMKII by methionine oxidation. *Cell*. 2008;133:462-74.
37. McKinsey TA. Derepression of pathological cardiac genes by members of the CaM kinase superfamily. *Cardiovascular research*. 2007;73:667-77.
38. Wu X, Zhang T, Bossuyt J, Li X, McKinsey TA, Dedman JR, Olson EN, Chen J, Brown JH and Bers DM. Local InsP3-dependent perinuclear Ca²⁺ signaling in cardiac myocyte excitation-transcription coupling. *The Journal of clinical investigation*. 2006;116:675-82.

39. Bossuyt J, Chang CW, Helmstadter K, Kunkel MT, Newton AC, Campbell KS, Martin JL, Bossuyt S, Robia SL and Bers DM. Spatiotemporally distinct protein kinase D activation in adult cardiomyocytes in response to phenylephrine and endothelin. *The Journal of biological chemistry*. 2011;286:33390-400.
40. Nichols CB, Chang CW, Ferrero M, Wood BM, Stein ML, Ferguson AJ, Ha D, Rigor RR, Bossuyt S and Bossuyt J. beta-adrenergic signaling inhibits Gq-dependent protein kinase D activation by preventing protein kinase D translocation. *Circulation research*. 2014;114:1398-409.
41. Takezako T, Unal H, Karnik SS and Node K. Current topics in angiotensin II type 1 receptor research: Focus on inverse agonism, receptor dimerization and biased agonism. *Pharmacological research*. 2017;123:40-50.
42. Harvey BJ and Thomas W. Aldosterone-induced protein kinase signalling and the control of electrolyte balance. *Steroids*. 2018;133:67-74.
43. Shapiro BA, Olala L, Arun SN, Parker PM, George MV and Bollag WB. Angiotensin II-activated protein kinase D mediates acute aldosterone secretion. *Mol Cell Endocrinol*. 2010;317:99-105.
44. Olala LO, Shapiro BA, Merchen TC, Wynn JJ and Bollag WB. Protein kinase C and Src family kinases mediate angiotensin II-induced protein kinase D activation and acute aldosterone production. *Mol Cell Endocrinol*. 2014;392:173-81.
45. Tan M, Xu X, Ohba M and Cui MZ. Angiotensin II-induced protein kinase D activation is regulated by protein kinase Cdelta and mediated via the angiotensin II type 1 receptor in vascular smooth muscle cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2004;24:2271-6.
46. Geng J, Zhao Z, Kang W, Wang W, Liu G, Sun Y, Zhang Y and Ge Z. Hypertrophic response to angiotensin II is mediated by protein kinase D-extracellular signal-regulated kinase 5 pathway in human aortic smooth muscle cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 2009;388:517-22.

47. Xu X, Ha CH, Wong C, Wang W, Hausser A, Pfizenmaier K, Olson EN, McKinsey TA and Jin ZG. Angiotensin II stimulates protein kinase D-dependent histone deacetylase 5 phosphorylation and nuclear export leading to vascular smooth muscle cell hypertrophy. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2007;27:2355-62.
48. Christensen GL, Kelstrup CD, Lyngso C, Sarwar U, Bogebo R, Sheikh SP, Gammeltoft S, Olsen JV and Hansen JL. Quantitative phosphoproteomics dissection of seven-transmembrane receptor signaling using full and biased agonists. *Molecular & cellular proteomics : MCP.* 2010;9:1540-53.
49. Ackers-Johnson M, Li PY, Holmes AP, O'Brien S-M, Pavlovic D and Foo RS. A Simplified, Langendorff-Free Method for Concomitant Isolation of Viable Cardiac Myocytes and Non-Myocytes from the Adult Mouse Heart. *Circulation research.* 2016.
50. Lincoln T, Dey N, Sellak H. Signal Transduction in smooth muscle. Invited review: cGMP-dependent protein Kinase signaling mechanisms in smooth muscle: from the regulation of tone to gene expression. *Journal of Applied Physiology.* 2001; 91
51. Uchinoumi H, Yang Y, Oda T, Li N, Alsina KM, Puglisi JL, Chen-Izu Y, Cornea RL, Wehrens XHT and Bers DM. CaMKII-dependent phosphorylation of RyR2 promotes targetable pathological RyR2 conformational shift. *Journal of molecular and cellular cardiology.* 2016;98:62-72.
52. Ljubojevic S, Radulovic S, Leitinger G, Sedej S, Sacherer M, Holzer M, Winkler C, Pritz E, Mittler T, Schmidt A, Sereinigg M, Wakula P, Zissimopoulos S, Bisping E, Post H, Marsche G, Bossuyt J, Bers DM, Kockskamper J and Pieske B. Early remodeling of perinuclear Ca²⁺ stores and nucleoplasmic Ca²⁺ signaling during the development of hypertrophy and heart failure. *Circulation.* 2014;130:244-55.
53. Silva MF, Pelúzio MCG, Amorim PRS, Lavorato VN, Santos NP, Bozi LH, Penitente AR, Falkoski DL, Berfort FG, Natali AJ. Treinamento em natação atenua a disfunção contrátil de cardiomiócitos de ratos diabéticos. *Arq. Bras. Cardiol., v. 97, n. 1, p.33-39, 2011.*

54. Rang, HP et al. Noradrenergic transmission. Rang & Dale's Pharmacology. [S.l.]: Elsevier, p. 168-188, 2007a.
55. Rang, HP et al. The vascular system. Rang & Dale's Pharmacology. [S.l.]: Elsevier, p. 298-320, 2007b.
56. Surks HK, Mochizuki N, Kasai Y, et al. Regulation of myosin phosphatase by a specific interaction with cGMP-dependent protein kinase I α . Science. v. 286, n. 5444, p. 1583-1587, Nov. 1999.
57. Ogut, O, Brozovich, F V. Regulation of force in vascular smooth muscle. Journal of Molecular and Cellular Cardiology v. 35, n. 4, p. 347-355, Abr. 2003.
58. Savoia C, Touyz RM, Volpe M, Schiffrin EL. Angiotensin type 2 receptor in resistance arteries of type 2 diabetic hypertensive patients. Hypertension, 2007;49(2):341-6.
58. Wei Cai, Li-ming Ruan, Yi-na Wang & Jun-zhu Chen. Effects of angiotensin II on connexin 43 of VSMCs in arteriosclerosis. Journal of Zhejiang University Science, 2006B:7, 648–653.
59. Suzuki H, Motley ED, Frank GD, Utsunomiya H, Eguchi S. Recent progress in signal transduction research of the angiotensin II type-1 receptor: protein kinases, vascular dysfunction and structural requirement. Curr Med Chem Cardiovasc Hematol Agents. 2005 Oct;3(4):305-22.
60. Griending KK, Sorescu D, Lassègue B, Ushio-Fukai M. Modulation of protein kinase activity and gene expression by reactive oxygen species and their role in vascular physiology and pathophysiology. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2000; 20(10):2175-83.
61. Ohtsu H, Mifune M, Frank GD, Saito S, Inagami T, Kim-Mitsuyama S, Takawa Y, Sasaki T, Rothstein JD, Suzuki H, Nakashima H, Woolfolk EA, Motley ED, Eguchi S. Signal-crosstalk between Rho/ROCK and c-Jun NH₂-terminal kinase mediates migration of vascular smooth muscle cells stimulated by angiotensin II. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2005. 25(9):1831-6.

62. Rush JW, Aultman CD. Vascular biology of angiotensin and the impact of physical activity. *Appl Physiol Nutr Metab*, 2008. 33(1):162-72.
63. Scheuer DA, Perrone MH. Angiotensin type 2 receptors mediate depressor phase of biphasic pressure response to angiotensin. *Am J Physiol*, 1993. 264: 917-23.
64. Griendling KK, Alexander RW. Endothelial control of the cardiovascular system: recent advances, 1996. *Faseb J*. 10(2):283-92;
65. Steckelings UM, Kaschina E, Unger T. The AT2 receptor--a matter of love and hate. *Peptides*, 2005; 26(8):1401-9.
66. Stoll M & Unger T. Angiotensin and its AT2 receptor: new insights into an old system. *Regulatory peptides*, 2001; 99(2-3):175-182
67. Huang Z, Chen Y, Pratt S, Chen TH, Bambino T, Nissenson RA, Shoback DM. The N-terminal region of the third intracellular loop of the parathyroid hormone (PTH)/PTH-related peptide receptor is critical for coupling to cAMP and inositol phosphate/Ca²⁺ signal transduction pathways. *J Biol Chem*, 1996. 271(52):33382-9.
68. Araújo MA, Goulart LR, Cordeiro ER, Gatti RR, Menezes BS, Lourenço C, Silva HD. Genotypic interactions of renin-angiotensin system genes in myocardial infarction. *Int J Cardiol*, 2005. 3;103(1):27-32.
69. Kiseleva RY, Glassman PM, Greineder CF, Hood ED, Shuvaev VV, Muzykantov VR. Targeting therapeutics to endothelium: Are we there yet? *Drug Deliv Transl Res*. 2018; 8(4):883-902.
70. Michel Félétou, Ralf Köhler & Paul M. Vanhoutte. Nitric oxide: Orchestrator of endothelium-dependent responses. *Acta Physiol*. 2015;(4)213:747-9
71. Pagan LU; Gomes MJ; Okoshi MP. Função Endotelial e Exercício Físico. *Arq. Bras. Cardiol*, 2018. V.111 no.4..
72. Ferreira AS; Gomes RPM; Fonseca AFA e Navarro AC. Atuações do óxido nítrico e da suplementação de L-arginina nas respostas hemodinâmicas e

metabólicas do organismo diante da prática do exercício físico. Revista Brasileira de Nutrição Esportiva ISSN 1981-9927 versão eletrônica.

73. Rajendran P, Rengarajan T, Thangavel J, Nishigaki Y, Sakthisekaran D, Sethi G, et al. The vascular endothelium and human diseases. *Int J Biol Sci.* 2013, 9;9(10):1057-69.

74. KUBES, P.; SUZUKI, M.; GRANGER, D. N. Nitric oxide : An endogenous modulator of leukocyte adhesion. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, v. 88, n. June, 1991; 4651–4655.

75. Zago, A.S.; Zanesco, A. Óxido Nítrico, Doenças Cardiovasculares e Exercício Físico. *Arq Bras Cardiol. São Paulo.* Vol. 87. Num. 6. 2006. p. 264-270.

76. Moncada, S.; Palmer, R. M.; Higgs, E. A. Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. *Pharmacological Reviews*, 1991; v. 43, n. 2, p. 109– 142.

77. Moncada, S.; Higgs, E. A. The discovery of nitric oxide and its role in vascular biology. *British Journal of Pharmacology*, 2006; v. 147, n. SUPPL. 1, p. 193–201.

78. Ito, S.A. Expressão da Óxido Nítrico Sintase em Músculo esquelético de Ratos Cronicamente Tratados com L-NAME, Estudo Histoenzimológicos, Bioquímicos e Imunohistoquímicos. Dissertação de mestrado apresentada à Universidade Estadual de Campinas. Campinas: UNICAMP. 2005.

79. Lucía Sánchez-Ruiloba; Clara Aicart-Ramos; Lucía García-Guerra; Julia Pose-Utrilla; Ignacio Rodríguez-Crespo; Teresa Iglesias. Protein Kinase D Interacts with Neuronal Nitric Oxide Synthase and Phosphorylates the Activatory Residue Serine1412. *PLOS ONE*, 2014; 4: 95191.

80. Forstermann U, Sessa WC Nitric oxide synthases: regulation and function. *Eur Heart J*, 2012; 33(7):829-37.

81. Brecht DS, Hwang PM, Glatt CE, Lowenstein C, Reed RR, et al. Cloned and expressed nitric oxide synthase structurally resembles cytochrome P-450 reductase. *Nature*, 1991; 351: 3.
82. Rodriguez-Crespo I, Straub W, Gavilanes F, Ortiz de Montellano PR. Binding of dynein light chain (PIN) to neuronal nitric oxide synthase in the absence of inhibition. *Arch Biochem Biophys* 359. 1998; 15;359(2):297-304.
83. Christopherson KS, Hillier BJ, Lim WA, Brecht DS. PSD-95 assembles a ternary complex with the N-methyl-D-aspartic acid receptor and a bivalent neuronal NO synthase PDZ domain. *J Biol Chem*, 1999; 274: 27467–27473. 16.
84. Sattler R, Xiong Z, Lu WY, Hafner M, MacDonald JF, et al. Specific coupling of NMDA receptor activation to nitric oxide neurotoxicity by PSD-95 protein. *Science*, 1999; 284: 1845–1848.
85. Cui H, Hayashi A, Sun HS, Belmares MP, Cobey C, et al. PDZ protein interactions underlying NMDA receptor-mediated excitotoxicity and neuroprotection by PSD-95 inhibitors. *J Neurosci*, 2007; 27: 9901–9915.
86. Doucet MV, Harkin A, Dev KK. The PSD-95/nNOS complex: new drugs for depression? *Pharmacol Ther*, 2012; 133: 218–229. 19.
87. Lopez-Menendez C, Gascon S, Sobrado M, Vidaurre OG, Higuero AM, et al. Kidins220/ARMS downregulation by excitotoxic activation of NMDARs reveals its involvement in neuronal survival and death pathways. *J Cell Sci*, 2009; 122: 3554–3565.
88. Okamoto K, Aoki K. Development of a strain of spontaneously hypertensive rats. *Jpn Circ J*, 1963; 27:282-93.
89. Intengan, H D; Schiffrin, E L. Structure and mechanical properties of resistance arteries in hypertension: role of adhesion molecules and extracellular matrix determinants. *Hypertension*, 2000; 36, n.3: 312–8.
90. Martinez-Lemus, Luis A; Hill, Michael A; Meininger, Gerald A. The plastic nature of the vascular wall: a continuum of remodeling events contributing to

control of arteriolar diameter and structure. *Physiology* (Bethesda, Md.), 2009; v. 24, n. 1, p. 45–57.

91. Mulvany, Michael J. Small artery remodelling in hypertension: causes, consequences and therapeutic implications. *Medical & Biological Engineering & Computing*, 2008; v. 46, n. 5, p. 461–467.

92. Mulvany MJ. Vascular remodelling of resistance vessels: can we define this? *Cardiovascular research*, 1999; v. 41, n. 1, p. 9–13.

93. Mulvany, M J et al. Vascular remodeling. *Hypertension*, 1996; v. 28, n. 3, p. 505–6.

94. Carretero, Oscar A. Vascular remodeling and the kallikrein-kinin system. *The Journal of Clinical Investigation*. 2005;115(3):588-591.

95. Resende RR; Guatimosim S; Leite MF. Sinalização de Cálcio: *Bioquímica e Fisiologia Celulares*. (p. 31) São Paulo: Savier, 2012.

96. E. Picht, A.V. Zima, L.A. Blatter, D.M. Bers. SparkMaster: automated calcium spark analysis with ImageJ. *Am. J. Physiol. Cell Physiol*, 2017; 293 (3).

97. Cheng H, Song LS, Shirokova N, Gonzalez A, Lakatta EG, Rios E, Stern MD. Amplitude distribution of calcium sparks in confocal images: theory and studies with an automatic detection method. *Biophys J*, 1999; 76: 606–617.

98. Pereira CLV; Ximenes CF; Merlo E; Sciortino AS; Monteiro JS; Moreira A; Jacobsen BB; Graceli JB; Ginsburg KS; Ribeiro Junior RF; Bers DM; Stefanon I. Cardiotoxicity of environmental contaminant tributyltin involves myocyte oxidative stress and abnormal Ca²⁺ handling. *Environmental Pollution*, 2019; 247: 371 e 382.

99. Andreas Rinne & Lothar A Blatter A fluorescence-based assay to monitor transcriptional activity of NFAT in living cells. *J Physiol*. 2010; 588: 3211–3216.

100. Nunes DO, Almenara CCP, Broseghini-Filho GB, Silva MASC, Ivanita I, Vassallo DV; Padilha AS. Flaxseed oil increases aortic reactivity to phenylephrine through reactive oxygen species and the cyclooxygenase-2 pathway in rats. *Lipids in Health and Disease* 2014, 13:107.

101. Dias FMV. Participação da Na⁺K⁺-ATPase e dos canais para K⁺ nas diferenças de reatividade de anéis isolados de aorta de ratos infartados com e sem sinais de insuficiência cardíaca. Tese de Doutorado, 2011. Programa de Pós-graduação em Ciências Fisiológicas Universidade Federal do Espírito Santo, Espírito Santo.
102. Abedi, H., Rozengurt, E, and Zachary, I. (1998) Rapid activation of the novel serine/threonine protein kinase, protein kinase D by phorbol esters, angiotensin II and PDGF-BB in vascular smooth muscle cells. *FEBS Lett.* 427, 209–212.
103. Tan, M., Xu, X., Ohba, M, and Cui, M. Z. () Angiotensin II-induced protein kinase D activation is regulated by protein kinase C delta and mediated via the angiotensin II type 1 receptor in vascular smooth muscle cells. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2004; 24, 2271–2276.
104. Xu, X., Ha, C. H., Wong, C., Wang, W., Hausser, A., Pfizenmaier, K., Olsen, E. N., McKinsey, T. A., and Jin, Z. G. (2007) Angiotensin II stimulates protein kinase D-dependent histone deacetylase 5 phosphorylation and nuclear export leading to vascular smooth muscle cell hypertrophy. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 27, 2355–2362.
105. IBARRA, M. et al. Endothelium-dependent inhibition of the contractile response is decreased in aorta from aged and spontaneously hypertensive rats. *Archives of Medical Research*, 2006; 3: 334–341.
106. CACANYIOVA, S. et al. The adaptive role of nitric oxide and hydrogen Sulphide in vasoactive responses of thoracic aorta is triggered already in young spontaneously hypertensive rats. *Journal of Physiology and Pharmacology*, 2016; 4: 501– 512.
107. Taddei S, Viridis A, Mattei P, Salvetti A. Vasodilation to acetylcholine in primary and secondary forms of human hypertension. *Hypertension*, 1993; 21: 929-33.
108. Zalba G, Beaumont FJ, San Jose G, Fortuno A, Fortuno MA, Diez J. Is the balance between nitric oxide and superoxide altered in spontaneously

hypertensive rats with endothelial dysfunction? *Nephrol Dial Transplant.* 2001;16 Suppl 1:2-5.

109. Grunfeld S, Hamilton CA, Mesaros S, McClain SW, Dominiczak AF, Bohr DF, Malinski T. Role of superoxide in the depressed nitric oxide production by the endothelium of genetically hypertensive rats. *Hypertension.* 1995; 26:854-7.

110. Hu WY, Chen DG, Chen SC, Jin XQ, Wang HJ. Effect of chronic captopril treatment on circulating and tissue renin-angiotensin system in SHR rats. *Zhongguo Yao Li Xue Bao*,1996; 6: 507-12.

111. Zhang L, Edwards DG, Berecek KH. Effects of early captopril treatment and its removal on plasma angiotensin converting enzyme (ACE) activity and arginine vasopressin in hypertensive rats (SHR) and normotensive rats (WKY). *Clin Exp Hypertens.* 1996; 2:201-26.

112. Chou TC, Yen MH, Li CY, Ding YA. Alterations of nitric oxide synthase expression with aging and hypertension in rats. *Hypertension.* 1998; 2:643-8.

113. Loria, A. S., Brinson, K. N., Fox, B. M. & Sullivan, J. C. Sex-specific alterations in NOS regulation of vascular function in aorta and mesenteric arteries from spontaneously hypertensive rats compared to Wistar Kyoto rats. *Physiol. Rep.* 2, e12125, <https://doi.org/10.14814/phy2.12125> (2014).

114. Piech, A., Dessy, C., Havaux, X., Feron, O. & Balligand, J. L. Differential regulation of nitric oxide synthases and their allosteric regulators in heart and vessels of hypertensive rats. *Cardiovasc. Res.* 57, 456–467 (2003).

115. Paravicini TM, Touyz RM. Redox signaling in hypertension. *Cardiovasc Res.* 2006 Jul 15; 2 :247-58.

116. Piech, A., Dessy, C., Havaux, X., Feron, O. & Balligand, J. L. Differential regulation of nitric oxide synthases and their allosteric regulators in heart and vessels of hypertensive rats. *Cardiovasc. Res.* 2003; 57, 456–467.

117. Vera, R. et al. Chronic administration of genistein improves endothelial dysfunction in spontaneously hypertensive rats: involvement of eNOS, caveolin

and calmodulin expression and NADPH oxidase activity. *Clin. Sci*, 2007; 112, 183–191.

118. Potje, S.R., Grando, M.D., Chignalia, A.Z. et al. Reduced caveolae density in arteries of SHR contributes to endothelial dysfunction and ROS production. *Sci Rep*, 2019; 9, 6696.

119. Sanchez-Ruiloba L, Aicart-Ramos C, Garcí'a-Guerra L, Pose-Utrilla J, Rodríguez-Crespo I, et al. (2014) Protein Kinase D Interacts with Neuronal Nitric Oxide Synthase and Phosphorylates the Activatory Residue Serine1412. *PLoS ONE*, 2014; 9(4).

120. Evans, I. M., Bagherzadeh, A., Charles, M., Raynham, T., Ireson, C., Boakes, A., Kelland, L., and Zachary, I. C. Characterization of the biological effects of a novel protein kinase D inhibitor in endothelial cells. *Biochem J*, 2010; 429, 565–572.

121. Ha, C. H., Wang, W., Jhun, B. S., Wong, C., and Hausser, A., Pfizenmaier, K., McKinsey, T. A., Olsen, E. N., and Jin, Z. G. () Protein kinase D-dependent phosphorylation and nuclear export of histone deacetylase 5 mediates vascular endothelial growth factor-induced gene expression and angiogenesis. *J. Biol. Chem*, 2008; 283: 14590–14599.

122. Aicart-Ramos C1, Sánchez-Ruiloba L2, Gómez-Parrizas M3, Zaragoza C4, Iglesias T5, Rodríguez-Crespo I. Protein kinase D activity controls endothelial nitric oxide synthesis. *J Cell Sci*, 2014; 127: 3360-72.

123. Gruetter CA, Barry BK, McNamara DB, Gruetter DY, Kadowitz PJ, Ignarro L. Relaxation of bovine coronary artery and activation of coronary arterial guanylate cyclase by nitric oxide, nitroprusside and a carcinogenic nitrosoamine. *J Cyclic Nucleotide Res*, 1979; 5(3):211-24.

124. Alvarez, Y. et al. Losartan reduces the increased participation of cyclooxygenase-2-derived products in vascular responses of hypertensive rats. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 2007; 321: 1, 381-388,

125. Beltrán, A.E., et al. MAPK contributes to angiotensin II-induced COX-2 expression in aortic fibroblasts from normotensive and hypertensive rats. *Journal of Hypertension*, 2009; v. 27, n. 1, p. 142-154.
126. Wolf, G. Free radical production and angiotensin. *Curr. Hypertens*, 2000; 2: 167-173.
127. Doughan, A.K.; Harrison, D.G.; Dikalov, S.I. Molecular mechanisms of angiotensin II-mediated mitochondrial dysfunction. Linking mitochondrial oxidative damage and vascular endothelial dysfunction. *Circ. Res*, 2008; 102: 488-496.
128. Shi ST, Li YF. Interaction of signal transduction between angiotensin AT1 and AT2 receptor subtypes in rat senescent heart *Chin Med J*. 2007;120(20):1820-1824.
129. Araújo MA, Menezes BS, Lourenço C, Cordeiro ER, Gatti RR, Goulart LR. O poliformismo A1166C do receptor tipo 1 da angiotensina II no infarto agudo do miocárdio. *Arquivos brasileiros de cardiologia*. 2004;83 (5):404-408.
130. Backs, J., Backs, T., Bezprozvannaya, S., McKinsey, T. A., and Olson, E. N. Histone deacetylase 5 acquires calcium/calmodulin-dependent kinase II responsiveness by oligomerization with histone deacetylase 4. *Mol. Cell. Biol*, 2008; 28, 3437–3445.
131. Storz, P., Doppler, H., and Toker, A. Protein kinase D mediates mitochondrion-to-nucleus signaling and detoxification from mitochondrial reactive oxygen species. *Mol. Cell. Biol*, 2005; 25, 8520–8530.